



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

Desarrollo de un sistema conservante con base de un extracto natural y tres aceites esenciales en la formulación de emulsiones cosméticas

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Ciencias
Farmacéuticas con mención en Ciencia y Tecnología Cosmética

AUTOR

Carlos Enrique CABRERA GARCÍA

ASESOR

Dr. José Roger JUÁREZ EYZAGUIRRE

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Cabrera C. Desarrollo de un sistema conservante con base de un extracto natural y tres aceites esenciales en la formulación de emulsiones cosméticas [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2020.

Información complementaria

Código ORCID del asesor (es)	0000-00002-1898-7590
Autor DNI (Obligatorio) Pasaporte /carnet de extranjería (sólo extranjeros)	41905238
Asesor DNI (Obligatorio)	10609613
Código ORCID del autor	0000-0002-5094-8364
Grupo de investigación	No pertenece
Financiamiento	Recursos propios
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación (incluirse localidades y/o coordenadas geográficas).	Lima – Perú
Año o rango de años que la investigación abarcó.	2017 – 2020



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado



ACTA DE SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS PARA OPTAR
AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS CON MENCIÓN EN CIENCIA
Y TECNOLOGÍA COSMÉTICA

Siendo las **10:00 hrs. del 25 de junio de 2020** se reunieron mediante la plataforma de Google meet de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Evaluador de tesis, presidido por el Dr. Américo Jorge Castro Luna e integrado por los siguientes miembros: Dr. José Roger Juárez Eyzaguirre (Asesor), Dr. Carlos Alejandro Bell Cortez y Mg. Bertran Santiago Trujillo; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **"DESARROLLO DE UN SISTEMA CONSERVANTE CON BASE DE UN EXTRACTO NATURAL Y TRES ACEITES ESENCIALES EN LA FORMULACIÓN DE EMULSIONES COSMÉTICAS"**, presentado por el Bachiller en Farmacia y Bioquímica **CARLOS ENRIQUE CARRERA GARCÍA**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magister en Ciencias Farmacéuticas con mención en Ciencia y Tecnología Cosmética**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

A continuación, el Jurado Evaluador de tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

20 (veinte) EXCELENTE

Luego, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Bachiller en Farmacia y Bioquímica **CARLOS ENRIQUE CARRERA GARCÍA**, el Grado Académico de **Magister en Ciencias Farmacéuticas con mención en Ciencia y Tecnología Cosmética**.

Siendo las **11:20** hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las **11:30** hrs. del 25 de junio de 2020.

Dr. Américo Jorge Castro Luna (P.P. D.E.)
Presidente

Dr. José Roger Juárez Eyzaguirre (P.P. T.C.)
Miembro - Asesor

Dr. Carlos Alejandro Bell Cortez (P.P. T.C.)
Miembro

Mg. Bertran Santiago Trujillo (P. Aux. T.P.)
Miembro

Observaciones:

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Dedico este trabajo a mis padres Carlos Cabrera y Dora García, que fueron mis primeros maestros y acompañaron mis primeros pasos y pensamientos.

Dedico este trabajo a Claudia Visa, por su gran y amoroso apoyo, por brindarme su gentil compañía y por regalarme un maravilloso futuro.

Agradezco profundamente al Dr. José Roger Juárez Eyzaguirre por su apoyo como asesor en el desarrollo del presente trabajo. Su guía y observaciones me permitieron mejorar y aprender enormemente.

Agradezco a los miembros del jurado calificador por el tiempo tomado en la revisión, por sus aportes y por sus observaciones que permitieron mejorar este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE TABLAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Situación problemática.....	1
1.2 Formulación del problema.....	2
1.3 Justificación teórica.....	2
1.4 Justificación práctica.....	2
1.5 Objetivos.....	3
2. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 Antecedentes de la investigación.....	4
2.2 Aspectos teóricos.....	17
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	19
3.1 Tipo de investigación.....	19
3.2 Extracto vegetal y aceites esenciales.....	20
3.3 Formulación del sistema conservante natural.....	22
3.4 Caracterización física del sistema conservante.....	23
3.5 Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos y aceites esenciales.....	24
3.6 Formulación de emulsiones cosméticas.....	25
3.7 Evaluación de eficacia conservante.....	27
3.8 Evaluación en condiciones de estabilidad.....	31
4. RESULTADOS.....	32
4.1 Caracterización física del conservante natural propuesto.....	32
4.2 Actividad antimicrobiana del extracto vegetal y aceites esenciales.....	33
4.3 Actividad antimicrobiana del conservante natural desarrollado.....	35
4.4 Eficacia antimicrobiana del control positivo y control negativo.....	36
4.5 Eficacia antimicrobiana del sistema natural propuesto.....	38
4.6 Evaluación en condiciones de estabilidad.....	44
5. DISCUSIÓN.....	47

6. CONCLUSIONES.....	51
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
8. ANEXOS.....	56

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de extractos.....	17
Tabla 2. Composición del sistema conservante desarrollado.....	22
Tabla 3. Fórmula cuali-cuantitativa de la emulsión O/W.....	25
Tabla 4. Fórmula cuali-cuantitativa de la emulsión W/O.....	27
Tabla 5. Criterios de evaluación de la norma ISO 11930:2012.....	29
Tabla 6. Fórmula cuali-cuantitativa del control negativo.....	30
Tabla 7. Fórmula cuali-cuantitativa del control positivo.....	30
Tabla 8. Actividad antimicrobiana del extracto de semillas de <i>Citrus paradisi</i>	33
Tabla 9. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de <i>Luma chequen</i>	33
Tabla 10. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i> ..	34
Tabla 11. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> .	34
Tabla 12. Actividad antimicrobiana del conservante natural desarrollado.....	35
Tabla 13. Recuento microbiano control negativo.....	36
Tabla 14. Reducción logarítmica microbiana control negativo.....	36
Tabla 15. Recuento microbiano control positivo.....	37
Tabla 16. Reducción logarítmica microbiana control positivo.....	37
Tabla 17. Recuento microbiano emulsión O/W con conservante natural al 0,25 %.....	38
Tabla 18. Reducción logarítmica microbiana emulsión O/W con conservante natural al 0,25 %.....	38
Tabla 19. Recuento microbiano emulsión O/W con conservante natural al 0,50 %.....	39

Tabla 20. Reducción logarítmica microbiana emulsión O/W con conservante natural al 0,50 %.....	39
Tabla 21. Recuento microbiano emulsión O/W con conservante natural al 1,0 %.	40
Tabla 22. Reducción logarítmica microbiana emulsión O/W con conservante natural al 1,0 %.....	40
Tabla 23. Recuento microbiano emulsión W/O con conservante natural al 0,25 %.....	43
Tabla 24. Reducción logarítmica microbiana emulsión W/O con conservante natural al 0,25 %.....	43
Tabla 25. Análisis organoléptico en condiciones de estabilidad acelerada.....	44
Tabla 26. Recuento microbiano emulsión O/W con conservante natural al 0,25 % en condiciones de estabilidad acelerada.....	44
Tabla 27. Reducción logarítmica microbiana emulsión O/W con conservante natural al 0,25 % en condiciones de estabilidad.....	45
Tabla 28. Análisis organoléptico en condiciones de estabilidad acelerada.....	45
Tabla 29. Recuento microbiano emulsión W/O con conservante natural al 0,25 % en condiciones de estabilidad acelerada.....	45
Tabla 30. Reducción logarítmica microbiana emulsión W/O con conservante natural al 0,25 % en condiciones de estabilidad.....	46
Tabla 31. Resumen de actividad antimicrobiana individual de los componentes...	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Parabenos más utilizados.....	4
Figura 2. Metodología de investigación.....	19
Figura 3. Extracto de semillas de <i>Citrus paradisi</i>	20
Figura 4. Aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i>	21
Figura 5. Conservante natural desarrollado envasado en gotero de vidrio ámbar tipo III.....	23
Figura 6. Aspecto de la emulsión a 25 °C.....	26
Figura 7. Inóculos para la prueba de desafío antimicrobiano.....	27
Figura 8. Incorporación del inóculo en un frasco con la muestra.....	28
Figura 9. Frasco con la muestra e inóculo.....	28
Figura 10. Dispersión de la muestra con espátula de Drigalsky.....	29
Figura 11. Conservante natural desarrollado.....	32
Figura 12. Miscibilidad en medio acuoso.....	32
Figura 13. Halo de inhibición <i>Escherichia coli</i>	35
Figura 14. Inhibición total: <i>Staphylococcus aureus</i>	35
Figura 15. Halo de inhibición <i>Pseudomonas aureginosa</i>	35
Figura 16. Halo de inhibición <i>Candida albicans</i>	35
Figura 17. Inhibición del crecimiento <i>E. coli</i>	41
Figura 18. Inhibición del crecimiento <i>P. aureginosa</i>	41
Figura 19. Inhibición del crecimiento <i>C. albicans</i>	41
Figura 20. Inhibición del crecimiento <i>S. aureus</i>	42
Figura 21. Inhibición del crecimiento <i>A. niger</i>	42

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue desarrollar un sistema conservante preparado a base de un extracto vegetal y tres aceites esenciales, para la formulación de emulsiones cosméticas. En una primera etapa se formuló el sistema conservante mezclando, en partes iguales, insumos comerciales de extracto de semillas de *Citrus paradisi*, con aceites esenciales de *Luma chequen*, *Melaleuca alternifolia* y *Cymbopogon citratus*, al que se determinó la actividad antimicrobiana, mediante el método de difusión en pocillos, frente a cepas de *Escherichia coli* (ATCC N°. 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC N°. 9027), *Staphylococcus aureus* (ATCC N°. 6538) *Candida albicans* (ATCC N°. 10231) y *Aspergillus niger* (ATCC N°. 16404). En una segunda etapa se aplicó el sistema conservante en una emulsión tipo O/W a tres concentraciones: 0,25; 0,50 y 1,0 % y se determinó la eficacia antimicrobiana según norma ISO 11930:2012. Finalmente se evaluó el desempeño del sistema conservante, en condiciones de estabilidad, sometiendo la emulsión O/W y otra emulsión W/O con 0,25% del conservante desarrollado, a 40 °C por 6 meses. Los resultados de actividad antimicrobiana para el sistema conservante fueron (halo de inhibición “mm”): *E. coli*: “13,00 ± 0,00”; *S. aureus*: “inhibición total”; *P. aeruginosa*: “12,33 ± 0,47”; *C. albicans*: “10,33 ± 0,47” y *A. niger*: “26,67 ± 0,47”. Los resultados de la prueba de eficacia antimicrobiana, para las emulsiones O/W con 0,25; 0,50 y 1,0 % de conservante desarrollado cumplen con el criterio A, de la norma ISO 11930:2012. Los resultados de la prueba de eficacia antimicrobiana, en condiciones de estabilidad, para las emulsiones O/W y W/O con 0,25% del conservante desarrollado, también cumplen con el criterio enunciado. Se concluye que el sistema conservante propuesto, posee actividad antimicrobiana frente a todos los microorganismos evaluados, además de eficacia como sistema conservante, desde una concentración de 0,25 %; brindando protección eficaz frente a contaminación microbiológica, según norma ISO 11930:2012.

Palabras clave: *Citrus paradisi* (toronja), *Luma chequen* (arrayán), *Melaleuca alternifolia* (árbol del té), *Cymbopogon citratus* (hierba luisa), eficacia antimicrobiana, conservante natural.

ABSTRACT

The objective of the present study was to develop a preservative system prepared based on a plant extract and three essential oils, for the formulation of cosmetic emulsions. In a first stage the preservative system was formulated by mixing, in equal parts, commercial samples of *Citrus paradisi* seed extract, with essential oils of *Luma chequen*, *Melaleuca alternifolia* and *Cymbopogon citratus*, to which the antimicrobial activity was determined, by agar well diffusion method against strains of *Escherichia coli* (ATCC No. 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC No. 9027), *Staphylococcus aureus* (ATCC No. 6538) *Candida albicans* (ATCC No. 10231) and *Aspergillus niger* (ATCC No. 16404). In a second stage the preservative system was applied in an emulsion O/W at three concentrations: 0.25; 0.50 and 1.0 % and antimicrobial efficacy was determined according to ISO 11930: 2012. Finally, the performance of the preservative system was evaluated, in conditions of stability, subjecting the emulsion O/W and another emulsion W/O with 0.25 % of the developed preservative, at 40 °C for 6 months. The results of antimicrobial activity for the preservative system were (halo inhibition "mm"): *E. coli*: "13.00 ± 0.00"; *S. aureus*: "total inhibition"; *P. aeruginosa*: "12.33 ± 0.47"; *C. albicans*: "10.33 ± 0.47" and *A. niger*: "26.67 ± 0.47". The results of the antimicrobial efficacy test, for the emulsions O/W with 0.25, 0.50 and 1.0 % of preservative developed comply with criterion A, of the ISO 11930: 2012 standard. The results of the antimicrobial efficacy test, in conditions of stability, for the emulsion O/W and emulsion W/O with 0.25 % of the preservative developed, also meet the stated criteria. It is concluded that the proposed preservative system has antimicrobial activity against all the microorganisms evaluated, in addition to efficacy as a preservative system, from a concentration of 0.25 %; providing effective protection against microbiological contamination, according to ISO 11930: 2012.

Keywords: *Citrus paradisi*, *Luma chequen*, *Melaleuca alternifolia*, *Cymbopogon citratus*, antimicrobial efficacy, natural preservative.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Situación problemática

Los conservantes son excipientes fundamentales en la formulación de productos farmacéuticos y cosméticos. Se incorporan con dos fines principales:

- Prolongar el tiempo de vida útil.
- Proteger al consumidor de una posible infección.

Los microorganismos pueden contaminar el producto durante todo su ciclo de vida, desde las materias primas, durante la manufactura hasta el consumo ¹.

Las bacterias y los miembros del reino fungi, son los principales microorganismos de interés en microbiología cosmética. Los hongos, por ejemplo, tienen potencial de generar desórdenes patológicos a razón de su capacidad de sintetizar un amplio rango de enzimas hidrolíticas ².

Las emulsiones son la base de muchos productos cosméticos (ej.: cremas y lociones). Las cuales, por contener una cantidad importante de agua en su composición, presentan un claro ejemplo de la necesidad del uso de conservantes.

Entre conservantes más frecuentemente utilizados en cosmética (principalmente en emulsiones), están los pertenecientes al grupo de los parabenos. El consumo de estos compuestos se inició en los años 30. Para el año 2004 se estimaba que los parabenos formaban parte de más de 22 000 productos cosméticos ³ y, en el 2013, se les podía encontrar hasta en 44 % de productos cosméticos ⁴.

Sin embargo, las tendencias actuales en cosmética buscan la reducción del uso de este tipo de insumos, debido a su presunta relación con algunos tipos de cáncer (especialmente cáncer de mama) ⁴, reacciones alérgicas y al deseo de los consumidores de contar con productos que contengan una mayor proporción de insumos naturales ⁵.

Como respuesta a esta problemática es necesario realizar estudios que contribuyan al desarrollo de productos “libres de conservantes sintéticos” o de manera más específica “libres de parabenos”; siendo uno de los casos más importantes y de aplicación, las emulsiones cosméticas.

1.2. Formulación del problema

1.2.1. Problema general

¿Un sistema conservante a base de un extracto vegetal y tres aceites esenciales, tiene actividad preservante al ser incorporado como insumo en una emulsión cosmética?

1.2.2. Problemas específicos

- ¿La actividad preservante del sistema conservante propuesto es comparable a la de los parabenos?
- ¿Cuál es el rango de concentraciones en que este sistema conservante permite dicha actividad?
- ¿La actividad preservante del sistema conservante propuesto es estable?

1.3. Justificación teórica

El desarrollo de este trabajo de investigación aportará conocimiento teórico y experimental sobre actividad antimicrobiana de los extractos vegetales y los aceites esenciales y su aplicabilidad como insumos conservantes en el rubro cosmético.

1.4. Justificación práctica

Las conclusiones de este estudio además, pueden brindar una solución práctica para la actividad de formuladores de productos cosméticos, tanto a nivel industrial, como magistral, mediante la incorporación de productos naturales como alternativas a los parabenos y otros conservantes sintéticos; aportando, de esta forma, información sobre el uso de combinaciones de extractos vegetales y aceites esenciales para el desarrollo de sistemas conservantes.

El desarrollo de este estudio de investigación permitirá finalmente generar un insumo cosmético nuevo con aplicación industrial y con un importante potencial comercial en el desarrollo de la fitocosmética, respondiendo a la actual demanda por insumos de origen natural y brindando una importante herramienta de marketing para el desarrollo de productos naturales.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general

Desarrollar un sistema preparado a base de un extracto vegetal y tres aceites esenciales que tenga efectividad como conservante en la formulación de emulsiones cosméticas.

1.5.2. Objetivos específicos

- Formular dos emulsiones cosméticas (tipo O/W y W/O) incluyendo un sistema conservante a base de extractos vegetales y aceites esenciales.
- Determinar un rango de concentración óptimo de dicho sistema conservante, en la formulación de emulsiones cosméticas.
- Someter dichas formulaciones a condiciones de estabilidad acelerada para determinar la acción del sistema conservante en dichas condiciones.

CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

2.1.1. Conservantes sintéticos

Entre los conservantes sintéticos frecuentemente utilizados en cosméticos tenemos: alcohol bencílico, ácido bórico, ácido sórbico, clorhexidina, formaldehído, compuestos de amonio cuaternario, fenol, compuestos imidazolidinyl y los parabenos³. Para el caso específico de las emulsiones cosméticas, los conservantes de más amplio uso son los parabenos (figura 1), especialmente metil y propilparabeno^{3,4}.

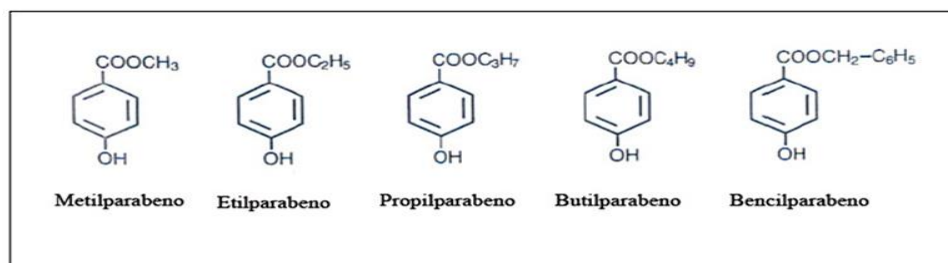


Figura 1. Parabenos más utilizados

La U.S. Food and Drug Administration (FDA) y la Cosmetic Toiletries and Fragrance Association (CTFA), en 2004, declararon a los parabenos como insumos seguros y eficaces para su uso en cosméticos. En 2006 el Scientific Committee on Consumer Products (SCCP) concluyó que los parabenos pueden ser usados de forma segura en cosméticos hasta concentraciones de 0,4 % para parabenos en forma individual y, hasta 0,8 %, para parabenos en combinación³.

Sin embargo, en los años recientes se evidencia una creciente percepción negativa de los consumidores respecto a los conservantes sintéticos⁶. Se conoce, que existe absorción sistémica de estos compuestos, evidenciándose, por ejemplo, en la presencia de ésteres de parabenos intactos en orina humana. Adicionalmente, se sabe que metilparabeno penetra ampliamente la piel y que los parabenos, en general, pueden acumularse en la piel³.

El ácido benzoico, ácido sórbico y sus respectivas sales, generalmente no son opciones para reemplazar a los parabenos en la formulación de emulsiones cosméticas, debido a que su rango de acción se encuentra por debajo de pH 5,0⁷; pero, las emulsiones cosméticas generalmente se formulan a valores de pH superiores.

Otros posibles sustitutos de los parabenos que podemos encontrar son: formaldehído, quaternium-15, imidazodínil urea, diazolidínil urea y dimetilodimetil hidantoina. Sin embargo estos conservantes frecuentemente producen reacciones alérgicas y otros problemas de salud⁴; muchos producen dermatitis de contacto en pieles sensibles³.

2.1.2. Conservantes naturales

Para el reemplazo de los conservantes sintéticos, una de las estrategias es buscar excipientes multifuncionales derivados de plantas que permitan la formulación sin dicho tipo de conservante^{8,9}, en relación a lo cual, tenemos una nueva tendencia que busca la aplicación de conservantes de origen natural. Entre los posibles candidatos se encuentran los extractos vegetales y los aceites esenciales que, a razón de sus propiedades antimicrobianas, han sido utilizados, alrededor del mundo, para el tratamiento de muchas afecciones y tienen menos efectos adversos que las respectivas drogas sintéticas¹⁰. Dichos compuestos además poseen actividad antifúngica y antiviral; por lo que están siendo evaluados a nivel global como fuente de nuevos compuestos antimicrobianos⁶.

Desde tiempos tempranos, los aceites esenciales han sido utilizados como saborizantes y fragancias en perfumería, industria farmacéutica, industria cosmética e industria alimentaria. La actividad antimicrobiana de algunos aceites esenciales, en específico, se ha conocido por muchos siglos y ha sido documentada en muchos trabajos científicos². Además, han sido utilizados como antisépticos y activos terapéuticos en medicina tradicional y aromaterapia. La evidencia sugiere, por ejemplo, que alrededor de 5 000 a.C., los antiguos egipcios sabían cómo preparar esencias de árboles de coníferas y usar mezclas aromáticas de aceites esenciales como material

antiséptico en el proceso de momificación. Los extractos vegetales y los aceites han sido utilizados además, para la preservación de productos cosméticos de manera tradicional ¹¹ y, actualmente, han ganado gran popularidad e interés científico, debido a su actividad antibacterial, antifúngica, antiviral, antiparasitaria y antidermatofítica ¹⁰. Otras actividades estudiadas son: antihelmíntica, antioxidante, antiinflamatoria, repelente, insecticida, antiviral, anestésica e inmunomoduladora ¹².

A varios aceites esenciales se les atribuye; por ejemplo, actividad antifúngica, sin efectos secundarios en humanos y animales. Estudios, tanto *in vitro* como *in vivo* sugieren que los aceites esenciales pueden utilizarse como agentes antifúngicos de manera efectiva. En años recientes, se ha generado interés en el desarrollo de agentes antifúngicos a partir de extractos vegetales y aceites esenciales ¹⁰.

2.1.3. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

Los aceites esenciales son compuestos sintetizados naturalmente como producto del metabolismo secundario vegetal; la mayoría de estos son volátiles y responsables del aroma de las plantas ¹³. Un rol importante de los aceites esenciales, en la naturaleza, es la protección de las plantas mediante acción antifúngica, antibacterial, antiviral e insecticida ⁶. Estos compuestos tienen amplia aplicación en los campos de la industria alimentaria, la medicina y la industria cosmética ¹⁴.

Los aceites esenciales tienen carácter ácido, lo cual influye en su actividad antimicrobiana. La acidez se opone a la multiplicación o proliferación microbiana y la alcalinidad la fomenta.

Un aspecto muy importante que genera controversia y resultados diferentes en diversos estudios es la estandarización de este tipo de productos, dado que la composición de extractos vegetales y aceites esenciales puede variar por diversas razones: los nutrientes del suelo, mutaciones e hibridaciones a través de generaciones, aclimatación al medio ambiente, etc¹⁵.

No es un principio activo único el que determina la actividad bactericida de un aceite esencial. Dependiendo de la especie, se calcula que un aceite esencial puede contener entre 50 a 300 componentes químicos, los cuales pertenecen principalmente a los grupos de hidrocarburos terpénicos, alcoholes, aldehídos, cetonas, éteres, ésteres, compuestos fenólicos, fenilpropanoides^{6,9,15,16}.

A pesar de la gran cantidad de compuestos presentes en los aceites esenciales, a menudo se encuentra que dos o tres componentes son los principales, que se encuentran en alta concentración (20 – 70%), que determinan sus propiedades biológicas. Los monoterpenos son las moléculas más frecuentemente encontradas constituyendo aproximadamente 90% de los aceites esenciales^{15,17}. Otros constituyentes de los aceites esenciales son: sesquiterpenos, terpenoides (derivados oxigenados, ésteres ácidos aromáticos y alifáticos), carbohidratos, compuestos fenólicos, alcoholes, éteres, cetonas, carotenoides, cumarinas y curcumina^{6,10,12}.

Los principales terpenos son los monoterpenos ($C_{10}H_{16}$) y sesquiterpenos ($C_{15}H_{24}$). Adicionalmente terpenos de cadena más larga como diterpenos ($C_{20}H_{32}$), triterpenos ($C_{30}H_{40}$) y otros también se encuentran presentes en menor proporción. Compuestos tales como p-cymene, limonene, menthol, geraniol, thymol, γ -terpinene y cinnamyl alcohol son ejemplos de compuestos de esta serie con actividad antimicrobiana⁶.

Modificaciones bioquímicas de los terpenos adicionan moléculas de oxígeno y mueven o retiran grupos metilo, resultando en la formación de terpenoides. thymol, carvacrol, linalool, linalyl acetate, citronellal, piperitone, menthol y geraniol son ejemplos de terpenoides⁶.

Los compuestos fenólicos poseen la más alta propiedad antimicrobiana, seguidos de alcoholes, aldehídos, cetonas, éteres e hidrocarburos. Los compuestos oxigenados poseen un potencial más alto, especialmente compuestos de tipo fenol como timol y carvacrol. Se ha encontrado que los monoterpenos oxigenados exhiben una fuerte actividad antimicrobiana, mientras que los monoterpenos hidrocarbonados poseen

propiedades antimicrobianas más bajas, ya que su baja solubilidad en agua limita su difusión a través del medio. Esta inactividad está estrechamente relacionada con su capacidad limitada de formar puentes de hidrógeno. Las cetonas, aldehídos y alcoholes son activos, pero con diferentes especificidades y niveles de actividad, que se relacionan con el presente grupo funcional, pero también se asocian con parámetros de puentes de hidrógeno, en todos los casos ⁹.

La actividad antimicrobiana de compuestos fenólicos, tales como thymol y carvacrol, es atribuida a un daño funcional y estructural de la membrana citoplasmática ⁶. La interacción con las enzimas de membrana y proteínas, puede causar el flujo opuesto de protones, afectando la actividad celular ².

Además, cabe referir que el rol antimicrobiano de los flavonoides presentes en los aceites esenciales, se encuentra bien documentado ¹⁴.

Con respecto a su seguridad, la FDA ha reconocido a los aceites esenciales como sustancias seguras (GRAS: generally recognized as safe). Muchos aceites esenciales y sus constituyentes (ej. carvone, carvacrol, cinnamaldehyde, thymol, linalool, citral, limonene, eugenol y mentol) pueden utilizarse como aditivos antibacteriales y muchos han sido aprobados también como saborizantes y aditivos alimentarios ^{6,12}.

El extracto de semillas de *Citrus paradisi* (toronja) ⁴, el aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* (árbol del te), el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) ¹⁷ y el aceite esencial de *Luma chequen* (arrayán), son ejemplos de productos disponibles comercialmente, en los que se tiene antecedentes de actividad antimicrobiana; sin embargo, se dispone de pocos estudios que evalúen la aplicación de estos derivados vegetales como insumos cosméticos.

2.1.4. Mecanismo de acción

Los componentes activos de los aceites esenciales, atacan a los microorganismos patógenos a través de la pared y la membrana celular ¹⁰. Esta actividad podría deberse, en parte, a la hidrofobicidad de los aceites

esenciales, que permite su difusión en la bicapa lipídica de la membrana celular, alterando su estructura y permeabilidad generando en consecuencia, la fuga del contenido celular^{6,10}.

El mecanismo de acción de algunos aceites esenciales específicos ha sido elucidado en trabajos de investigación previos; sin embargo, aún falta un conocimiento detallado sobre el mecanismo de acción de muchos otros. Los principales mecanismos de acción propuestos para estos productos son: aumento de la permeabilidad de la membrana a iones y desestabilización el empaquetamiento de la bicapa lipídica¹⁵. Se cree que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales es el resultado de una perturbación del sistema enzimático involucrado en la producción de energía y la síntesis de componentes estructurales². Por lo tanto, los aceites esenciales primero desestabilizan la arquitectura celular llevando a la ruptura de la membrana celular, incrementando la permeabilidad, afectando a funciones esenciales como la respiración celular, síntesis de macromoléculas y funciones de regulación del metabolismo¹³.

La actividad antifúngica de los aceites esenciales se puede atribuir a la presencia de componentes tales como carvacrol, α -terpinly acetate, cymene, thymol, pinene, linalool. Esta actividad se asocia con la desintegración de las hifas debido a compuestos monoterpenos y sesquiterpenos presentes en los aceites esenciales.

En un estudio, se comparó la actividad antimicrobiana de algunos aceites esenciales con la de sus principales componentes por separado, encontrándose una respuesta diferente. Esto sugiere que los componentes presentes en mayor proporción, por sí mismos, no son necesariamente responsables, en mayor medida, de la actividad antimicrobiana total. Esto podría ser explicado, por un efecto sinérgico de diferentes componentes⁹.

2.1.5. Sistemas conservantes naturales a base de extractos vegetales y aceites esenciales

Los aceites esenciales y los extractos vegetales, como conservantes naturales, pueden ser eficientes e inclusive pueden brindar características

deseables a los productos terminados; pero, su uso es desalentado por algunos autores debido principalmente a lo siguiente ⁸:

- Actividad menor a la de los conservantes sintéticos.
- Su actividad es más específica que la de los conservantes sintéticos, por lo que un sólo extracto o esencia podría no brindar un amplio espectro ¹⁸.
- En algunos casos pueden causar alergias cutáneas ⁸.
- Muchos de los aceites esenciales poseen un aroma muy potente que podría ser traspasado al producto final ^{1,8}.
- Los aceites esenciales generalmente son sensibles a oxígeno, luz, humedad y calor ⁶.

Sin embargo, para superar estos posibles inconvenientes, se puede formular un agente conservante resultante de la asociación de más de un extracto o esencia vegetal ⁶. El uso de una mezcla de conservantes puede tener un efecto sinérgico, a partir de la interacción química de sus componentes, contra los microorganismos ^{3,19}. Un ejemplo de esto es observado entre especies de la familia Lamiaceae ²⁰.

Con el uso de una asociación de más de un extracto o aceite esencial (sistema conservante), se puede; por lo tanto, obtener los siguientes beneficios:

- Ampliar el espectro de acción del conservante.
- Reducir la cantidad necesaria de cada extracto o esencia individual.
- Minimizar la posibilidad de generación de alergias.
- Minimizar la posibilidad de generación de resistencia bacteriana debido a presencia de varios compuestos activos en un mismo sistema ¹⁹.

2.1.6. Extracto de semillas de *Citrus paradisi* (toronja)

Citrus paradisi es una especie vegetal perteneciente a la familia Rutaceae. Es considerada una especie importante para la producción mundial, debido a su alto valor en la dieta humana. Numerosas investigaciones han sido desarrolladas debido a su importancia nutraceútica y económica ¹⁹.

Ha sido ampliamente utilizado alrededor del mundo durante cientos de años, siendo considerado un antibiótico natural ^{21,22}.

Takeoka, 2011, el contenido de conservantes sintéticos en muestras comerciales de extracto de semillas de *Citrus paradisi* (toronja) identificando cloruro de benzetonio en las muestras evaluadas ²³. Sin embargo, algunos autores señalan que la presencia de cloruro de benzetonio en algunas muestras comerciales del extracto, puede tener su origen en la amonización de los flavonoides presentes en el extracto, durante el proceso de fabricación ²¹.

Cvetnic, 2004, evaluó la actividad antibacterial y antifúngica de un extracto comercial de semilla de *Citrus paradisi* (Grapefruit extract 33 %) y de un extracto de elaboración propia. Encontró actividad antibiótica frente a *Salmonella enteriditis* y otros microorganismos para ambos productos. Siendo la muestra comercial la que presenta mayor actividad, postuló que la mayor actividad puede deberse posiblemente a diferencias en el contenido de polifenoles y no necesariamente por contaminación con conservantes sintéticos ²⁴.

Un estudio más reciente llevado a cabo por Waidulla, 2011, evaluó la actividad antimicrobiana de dos extractos de *Citrus paradisi* (uno acuoso y uno alcohólico), llegando a la conclusión de que el extracto acuoso presenta mayor actividad ²⁵.

El *extracto de semillas de Citrus paradisi (toronja)*, reporta un contenido de 3,92 % de polifenoles totales y 0,11 % de flavonoides ²⁴, señalados como responsables de la actividad antibacteriana, propuestos en diversos estudios.

2.1.7. Aceite esencial de *Luma chequen* (arrayán)

Es una especie perteneciente a la familia Myrtaceae. Es una planta arborescente de 5 a 6 m de altura que crece desde los 2 500 a los 4 000 m de altitud en los Andes de Sudamérica Central entre Perú, Bolivia y Chile.

Las hojas han sido ampliamente usadas para el tratamiento de desórdenes gastrointestinales, infecciones post-parto y dolor de muelas²⁶.

Durante la producción del aceite esencial, por el método de destilación por arrastre de vapor, se alcanza un rendimiento aproximado de 0,19%¹⁶.

Los compuestos fenólicos del aceite esencial son considerados como responsables de la actividad antimicrobiana, seguidos de aldehídos, cetonas y alcoholes¹⁰.

Presenta actividad frente a *Streptococcus mutans*²⁷, hay referencia de su aplicación en la formulación de colutorios²⁸.

El aceite esencial se caracteriza por la presencia de pequeñas cantidades de sesquiterpenos (3,1%) y una gran cantidad de monoterpenos (90,1%), de los cuales α -pinene (57,1%), 1,8-cineole (12.1%) y linalool (5,5%) son los componentes mayores²⁶.

Otros estudio reporta 61,19% de α -pineno, 8,18% de β -pineno y 7.14% de linalol²⁸.

2.1.8. Aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa)

Las especies del género *Cymbopogon* son una fuente importante de aceites esenciales de interés comercial dado que poseen actividad antioxidante y actividad antimicrobiana²⁹. *Cymbopogon citratus* es una especie perteneciente a la familia Poaceae. El aceite esencial se utiliza en aromaterapia como carminativo y estomacal. Es un estimulante gástrico útil para gastroenteritis y colitis. Tiene además propiedades nervinas que ayudan a regular al sistema nervioso autónomo. Tiene efecto antimicrobiano frente a *Staphylococcus aureus*.

Alzamora en 2011, desarrolló una investigación en la que evaluó los aceites esenciales de cinco plantas empleadas en medicina tradicional en el Perú. Los aceites esenciales fueron obtenidos por el método de arrastre de vapor. El método empleado para evaluar la actividad antimicrobiana

fue el de difusión en agar. El aceite esencial que ejerció mayor actividad antimicrobiana fue el de *Cymbopogon citratus*³⁰.

Dreger, 2014, señaló al aceite esencial de *Cymbopogon citratus* como uno de los derivados vegetales que ha demostrado actividad y es propuesto como un conservante natural¹⁷.

El aceite esencial de *Cymbopogon citratus* presenta actividad frente a *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa*^{6,12,13}; además presenta actividad frente a *Cladosporium sp.*, *Aspergillus niger*, el género *Mucor*, dermatofitos y *Candida albicans*¹⁰.

El aceite esencial de *Cymbopogon citratus* presenta actividad también frente a miembros del reino fungi, tales como: *Aspergillus flavus*, *Neurospora sitophila* y *Penicillium digitatum*; además frente a *Erwinia carotovora*, *Erwinia herbicola*, *Raistonia solanacearum*, *Aspergillus ochraceus*¹².

Cymbopogon citratus, contiene compuestos antimicrobianos correspondientes al grupo de los monoterpenos, sesquiterpenos y terpenoides^{6,29}. Los principales componentes del aceite esencial son: citral-a o geranial (10% – 48%), citral-b o neral (3% - 43%), borneol (5%), geraniol (2,6-40%), geranyl acetate (0.1%-3.0%), linalool (1.2%-3.4%) y nerol (0.8%-4.5%). Citral-a y citral-b poseen actividad antibacterial frente a Grampositivas y Gramnegativas²⁹. Entre estos componentes presentan actividad frente a hongos: geranial, neral, citronellol y limonene, son alcoholes alifáticos^{10,29}.

2.1.9. Aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* (árbol del té)

Es una especie perteneciente a la familia Myrtaceae. La composición del aceite esencial de *Melaleuca alternifolia*, comercializado, está estandarizado según la norma ISO 4730:2004. Se obtiene al destilar con vapor las hojas y de las ramas terminales del árbol. Posee una densidad relativa entre 0,885 a 0,906, es escasamente miscible en agua, miscible en

solventes no polares, lo cual limita la evaluación de su actividad antimicrobiana³¹.

El aceite esencial tiene un largo uso como antiséptico tópico y conservante natural en muchos productos cosméticos para uso externo^{5,32}. Se le utiliza en jabones líquidos para lavado de cara y manos, geles contra el acné, cremas vaginales, talcos para pies, shampoos, acondicionadores y productos veterinarios para cuidado de la piel³³. Se utiliza en la aromaterapia para el tratamiento de lesiones producidas por el frío, herpes, sinusitis, infecciones de la garganta, males respiratorios, pie de atleta, tiña, aftas y otras infecciones. En combinación con otros compuestos antimicrobianos ha sido utilizada en el tratamiento de infecciones tópicas. Varias publicaciones han reportado la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Melaleuca alternifolia*. Tiene un amplio espectro, teniendo actividad antibacterial, antifúngica, antiviral y antiprotozoaria^{31,32}. Presenta actividad *in vitro*, contra *Alternaria brassicicola*, *Aspergillus flavus*, *Bipolaris oryzae*, *Fusarium moliniforme*, *F. proliferatum*, *Pyricularia arisea* y *Rhizoctonia solani*. Presenta actividad además, frente a *C. albicans*¹⁰.

La combinación de menta y aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* muestra un efecto sinérgico frente a *Aspergillus niger*⁶.

El aceite esencial vaporizado puede inhibir el desarrollo de bacterias tales como: *Mycobacterium avium*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus pneumoniae*³¹.

Los primeros estudios de actividad antifúngica se realizaron frente a *Candida albicans*. Ahora se sabe que posee actividad frente a un amplio rango de levaduras, dermatofitos y otros hongos filamentosos³¹. El aceite esencial presenta actividad frente a *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* y *Pyrenophora graminea* que son miembros del reino fungi que generan patogenicidad en cereales³⁴.

Cabe señalar que *Pseudomonas aeruginosa* presenta resistencia a la actividad del aceite esencial de *Melaleuca alternifolia*. Soportando inclusive una exposición a una concentración de 8 %³³.

La estabilidad del aceite esencial puede afectarse por la luz, el calor y la exposición al aire. Debe ser almacenado en un ambiente oscuro, fresco y seco, preferiblemente con poco aire³¹.

La seguridad del uso del aceite esencial se basa principalmente en más de 80 años de uso con reacciones adversas infrecuentes. Se cree que las reacciones alérgicas ocasionalmente reportadas, son causadas principalmente por los productos de oxidación generados por un almacenamiento inadecuado³¹.

Las características físicas del aceite esencial dificultan su formulación y la definición del envase. Su lipoficidad causa problemas de miscibilidad en productos con base acuosa. Adicionalmente se debe considerar que el empaque debe prevenir la pérdida de los compuestos volátiles. Adicionalmente se sabe que el aceite es absorbido en envases plásticos³¹.

El aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* está compuesto de terpenos, principalmente monoterpenos cíclicos (aproximadamente 50% son oxigenados), sesquiterpenos y sus alcoholes asociados. Existen reportes que indican la existencia de aproximadamente cien componentes en el aceite esencial^{31,32}. Los terpenoides oxigenados son los componentes más activos³³.

2.1.10. Determinación de la eficacia antimicrobiana (Prueba de desafío antimicrobiano)

La prueba de eficacia antimicrobiana, también conocida como test de desafío antimicrobiano, se utiliza para verificar la capacidad de un sistema conservante para evitar o minimizar el desarrollo de microorganismos en un producto. Es una prueba *in vitro* que tiene una buena correlación respecto a la posible contaminación durante el uso³⁵.

Es un método de referencia que se utiliza para evaluar la conservación de una fórmula cosmética. Implica para cada microorganismo de ensayo, poner en contacto la fórmula con un inóculo estandarizado y luego medir los cambios en el recuento de microorganismos a intervalos de tiempo definidos, durante un periodo definido y a una temperatura definida³⁶.

La evaluación de la eficacia antimicrobiana de un sistema conservante debe realizarse evaluando su acción sobre el producto final ³⁷.

El método utilizado influye en los resultados obtenidos ³⁷. Entre los principales métodos existentes para la determinación de la eficacia antimicrobiana tenemos:

- USP 42: Capítulo General 51. Antimicrobial Effectiveness Testing.
- Ph. Eur. 7 – 5.1.3: Efficacy of Antimicrobial Preservation.
- ISO 11930: Evaluation of the Antimicrobial Protection of a Cosmetic Product.

En el año 2012 se publicó la primera edición de la norma ISO 11930 que es una norma general para evaluar la estabilización del poder antimicrobiano en productos cosméticos ³⁸. De acuerdo a la ISO 11930 no se requiere un test de eficacia antimicrobiana para aquellos productos cosméticos cuyo riesgo es considerado bajo, según la norma ISO 29621 ³⁵.

Esta prueba debe realizarse como parte del desarrollo de productos cosméticos, a fin de que se compruebe la eficacia del sistema conservante utilizado.

2.2. Aspectos teóricos

2.2.1. Conservante antimicrobiano

Los conservantes antimicrobianos son excipientes que se usan para matar o prevenir el crecimiento de bacterias, hongos filamentosos y levaduras. Actúan mediante una variedad de mecanismos. La mayoría actúan en la membrana celular, ocasionando daños y alteración de la permeabilidad celular. Otros mecanismos de acción incluyen inhibición del transporte, precipitación de proteínas y desacoplamiento del gradiente de protones. Algunos de los conservantes pueden actuar sinérgicamente (p.ej., combinaciones de parabenos)³⁹.

2.2.2. Sistema conservante

Un sistema conservante incluye tanto compuestos con actividad antimicrobiana conocida como otros componentes que pueden contribuir directa o indirectamente a la actividad antimicrobiana.

2.2.3. Extracto natural

Son preparados obtenidos por concentración parcial o total de los líquidos extractivos. Podemos distinguir diferentes tipos de extractos según la concentración de principio activo respecto a la droga original y según su consistencia (tabla 1)⁴⁰.

Tabla 1. Tipos de extractos

Extracto	Consistencia	Concentración	Estabilidad
Extracto fluido	Líquida	Similar a la droga	Poco estable a aire y luz.
Extracto blando	Semisólida	Superior a la droga	Muy inestable
Extracto seco	Pulverulenta	Superior a la droga	Estable, algo higroscópico
Crioextracto	Líquida	Superior a la droga	Estable

2.2.4. Aceite esencial

Los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos volátiles producidos por organismos vivos y aislados solo por medios físicos (prensado y destilación) de una planta completa o parte de una planta de origen taxonómico conocido. Los compuestos principales respectivos se derivan principalmente de tres rutas biosintéticas; la ruta del mevalonato que conduce a los sesquiterpenos, la ruta del metil-eritritol que conduce a los mono- y diterpenos, y la ruta del ácido shikímico en la ruta a los fenilpropanos. Sin embargo, hay un número casi incontable de sustancias individuales y una tremenda variación en la composición de los aceites esenciales⁴¹.

2.2.5. Emulsión cosmética

Es una mezcla de uno o más lípidos con un componente acuoso en presencia de estabilizadores de emulsión adecuados. Normalmente se requiere un emulsionante (o una mezcla de emulsionantes) para ayudar en la dispersión de una de las dos fases inmiscibles (aceite o agua). Las emulsiones cosméticas pueden proporcionar beneficios ya sea limpiando la superficie de la piel o entregando materiales beneficiosos a la misma.

CAPÍTULO 3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Tipo de investigación

En presente estudio es de tipo experimental puro (tipología de Campbell y Stanley) ⁴². Se desarrolló en dos etapas:

- Una primera etapa referida a la formulación del sistema conservante y la determinación de la actividad antimicrobiana del mismo.
- Una segunda etapa referida a la aplicación del sistema conservante desarrollado, en dos emulsiones cosméticas y la determinación de la eficacia del sistema conservante.

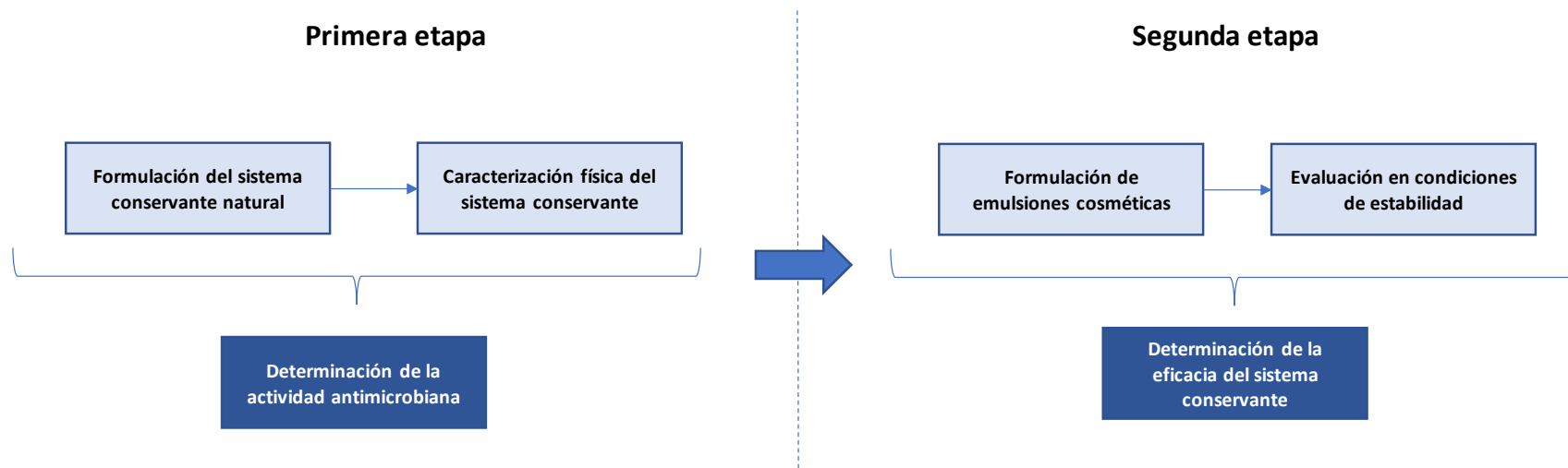


Figura 2. Metodología de investigación

3.2. Extracto vegetal y aceites esenciales

Los criterios para la elección del extracto y los aceites esenciales, para el desarrollo del sistema conservante natural, fueron:

- Presencia de antecedentes que brinden indicio de su actividad conservante y/o antimicrobiana.
- Su disponibilidad comercial.

Se seleccionaron los siguientes insumos comerciales:

- a) Extracto de semillas de *Citrus paradisi* (toronja)
Proveedor: Nutribiotic Lab. USA.



Figura 3. Extracto de semillas de *Citrus paradisi*

El extracto se presenta como un líquido viscoso, ligeramente ámbar (figura 3). La concentración del extracto es de 33 %. Se encuentra diluido en glicerina vegetal.

La incorporación del extracto de semillas de *Citrus paradisi* optimiza el desempeño del sistema, bajo los siguientes principios:

- Genera un efecto sinérgico incrementando la hidrofilia del sistema conservante⁶.
- Incrementa la estabilidad de los aceites esenciales por su actividad antioxidante.

b) Aceite esencial de *Luma chequen* (arrayán)

Proveedor: Aromática y Culinaria S.A.C. Perú.

El aceite se presenta como un líquido claro amarillento. La parte usada para la obtención de este aceite esencial, fueron las hojas y el método de extracción fue arrastre de vapor.

c) Aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* (árbol del té)

Proveedor: Aromática y Culinaria S.A.C. Perú.

El aceite esencial se presenta como un líquido incoloro a amarillo claro. La parte usada para la obtención de este aceite esencial, fueron las hojas y el método de extracción fue arrastre de vapor.

d) Aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa)

Proveedor: Aromática y Culinaria S.A.C. Perú.

El aceite esencial se presenta como un líquido color amarillo claro a amarillo (figura 4).



Figura 4. Aceite esencial de *Cymbopogon citratus*

La parte usada para la obtención de este aceite esencial, fueron las hojas y el método de extracción fue arrastre de vapor.

3.3. Formulación del sistema conservante natural

Con el fin de obtener un sistema conservante de amplio espectro y reducir la concentración individual requerida de cada componente, se formuló un sistema conservante, mezclando el extracto de semillas de *Citrus paradisi* y los tres aceites esenciales estudiados. Las concentraciones de cada componente (tabla 2) fueron determinadas tomando como referencia la información bibliográfica sobre la actividad individual de cada uno de ellos. El primer componente evaluado para formar la base del conservante desarrollado fue el extracto de *Citrus paradisi*, que es incorporado en una proporción de 25 %, dado que su objetivo es principalmente complementar la actividad de los aceites esenciales, incrementando la hidrofilia de la formulación. El segundo componente base de la formulación es el aceite esencial de *Cymbopogon citratus*, que es mezclado con el extracto de *Citrus paradisi* en partes iguales, dada su complementaridad (*Cymbopogon citratus* complementa la actividad frente a *Aspergillus niger*, dado que existen estudios reportan una menor actividad en productos derivados *Citrus paradisi*)^{14,43}. Para incrementar la actividad de esta base, se sumó en una proporción de 25 % el aceite esencial de *Melaleuca alternifolia*⁶ por contar con antecedentes de actividad sinérgica con otros aceites esenciales. Finalmente se incorporó en una proporción de 25 % el aceite esencial de *Luma chequen* para que complemente la protección del sistema con su actividad antioxidante⁴⁴.

Tabla 2. Composición del sistema conservante desarrollado

Componentes	Proporción (%p/p)
Extracto de semillas de <i>Citrus paradisi</i> .	25,00
Aceite esencial de <i>Luma chequen</i> .	25,00
Aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i> .	25,00
Aceite esencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> .	25,00
TOTAL	100,00

Los componentes fueron pesados y mezclados en un beaker de vidrio de 500 mL. Luego la mezcla fue agitada manualmente con una varilla de vidrio, por 3 minutos, formando una mezcla homogénea⁴⁵.

Los aceites esenciales que componen la formulación fueron protegidos de la luz; por lo cual, el conservante natural fue envasado en frascos goteros de vidrio ámbar tipo III (figura 5).



Figura 5. Conservante natural desarrollado envasado en gotero de vidrio ámbar tipo III

3.4. Caracterización física del sistema conservante

Se determinó los siguientes parámetros físicos:

a) Aspecto físico

Se determinó visualmente las características externas bajo luz blanca y sobre fondo oscuro ⁴⁵.

b) Miscibilidad

Se dispersó 100 mg de muestra en 200 mL de agua purificada y se verificó la homogeneidad de la dispersión ⁴⁵.

c) Índice de refracción

Se tomó 5 mL de muestra y se llevó a 20 °C, luego se leyó directamente en el refractómetro. Se leyó por quintuplicado la muestra y se promedió. El equipo utilizado fue un refractómetro marca Baush Lomb ⁴⁵.

d) Densidad

Se seleccionó un picnómetro que previamente fue calibrado mediante la determinación de su peso y el peso de agua contenida en este a 20 °C. Se ajustó la temperatura de la muestra aproximadamente a 18 °C y se llenó el picnómetro. Se ajustó la temperatura del picnómetro lleno a 20 °C, se retiró todo exceso de la muestra, y se pesó.

Cálculos:

$$(g / mL)Densidad_{20^{\circ}C} = 0,9982 \times \frac{(Peso \text{ pic. muestra} - Peso \text{ pic. vacío})}{(Peso \text{ pic. agua} - Peso \text{ pic. vacío})}$$

3.5. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos y esencias

Se determinó la actividad antimicrobiana de cada componente de manera individual y del sistema conservante desarrollado. El método utilizado fue difusión en pocillos. Las muestras se enfrentaron con tres cepas bacterianas: *Escherichia coli* (ATCC N°. 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC N°. 9027), *Staphylococcus aureus* (ATCC N°. 6538) y dos cepas de hongos: *Candida albicans* (ATCC N°. 10231), *Aspergillus niger* (ATCC N°. 16404)⁴⁵.

Los microorganismos señalados fueron incubados en TSA (bacterias) a 37 °C y agar sabouraud dextrosa a 35 (± 2 °C) (hongos y levaduras) durante 24 horas, luego de lo cual se suspendieron en solución salina estéril al 0,85 %. La turbidez se ajustó a un valor de 0,5 de acuerdo a la escala de Mc Farland para obtener una concentración de aproximadamente 1,5 x 10⁸ UFC/mL⁴⁵.

El medio de cultivo utilizado fue MHA (Mueller Hinton Agar). Los pocillos de 6 mm de diámetro se prepararon con un sacabocado estéril. Sobre dichos pocillos, se depositó 50 µL de muestra evaluada, a una concentración de 100 %. Se realizó la incubación a 35 ± 2 °C por un tiempo de 16 -18h (bacterias) y 20 – 24 h (hongos y levaduras). Se registró los diámetros (en mm) de los halos de inhibición formados. Los casos en los que no se evidenció crecimiento, fueron considerados como “inhibición total”⁴⁵.

Con el fin de realizar la interpretación de los resultados, se considera como mínima medida válida del halo de inhibición, un diámetro de 8 mm. Valores menores son

considerados como ausencia de actividad antimicrobiana. Esto es en base a otros estudios donde se evalúa actividad antimicrobiana de aceites esenciales^{9,46-48}.

3.6. Formulación de emulsiones cosméticas

Se desarrolló la formulación de dos emulsiones cosméticas, una emulsión tipo O/W y otra tipo W/O.

La actividad del aceite esencial depende de la concentración del aceite esencial libre (fuera de las miscelas) en la fase acuosa; por lo cual, la afinidad de los aceites esenciales por las micelas formadas por los tensoactivos, podría interferir también con su actividad antimicrobiana¹. En base a esto, los excipientes de las emulsiones fueron seleccionados de forma que no se tenga antecedentes de interferencia (positiva o negativa) en la actividad de los conservantes evaluados. Se descartó el uso de tween 20 y tween 80, dado que existe referencia de formación de miscelas o formación de complejos que pueden inactivar los compuestos fenólicos²⁹. Se descartó adicionalmente el uso de EDTA porque podría tener un efecto sinérgico con los aceites esenciales¹.

a) Formulación de emulsión cosmética O/W

Se formuló una emulsión O/W con 20 % de fase oleosa y 80 % de fase acuosa.

Tabla 3. Fórmula cuali-cuantitativa de la emulsión O/W

(Para tres concentraciones de conservante natural 0,25 %; 0,5 % y 1 %)

Descripción	%	Crema O/W con conservante natural 0,25 %		Crema O/W con conservante natural 0,50 %		Crema O/W con conservante natural 1,00 %	
		Cantidad	und	Cantidad	und	Cantidad	Und
		100	g	100	g	100	g
Alcohol cetílico	15,00	15,00	g	15,00	g	15,00	g
Conservante natural	-----	0,25	g	0,50	g	1,00	g
Cera espermaceti sintética	5,00	5,00	g	5,00	g	5,00	g
Sodio lauril sulfato	1,00	1,00	g	1,00	g	1,00	g
Agua purificada C.S.P.	100,00	100,00	g	100,00	g	100,00	g

El método de fabricación consistió en la dispersión de la fase oleosa sobre la fase acuosa que luego son emulsificadas a una temperatura entre 70 y 75 °C.

Se incorporó el sistema conservante natural propuesto en la etapa de enfriamiento cuando la emulsión alcance entre 50 y 55 °C, mediante agitación constante durante 3 minutos (en esta temperatura la emulsión mantiene una consistencia fluida, por lo que la agitación permite la homogenización completa).

Se verificó que el aspecto de las emulsiones resultantes fuera estable una vez que alcanzan una temperatura final de aproximadamente 25 °C (figura 6).



Figura 6. Aspecto de la emulsión a 25 °C.

b) Formulación de emulsión cosmética W/O

Se formuló una emulsión W/O con un 60 % de fase oleosa y 40 % de fase acuosa. Se decidió probar la eficacia del sistema conservante en una emulsión W/O dado que la afinidad de los aceites esenciales por excipientes lipofílicos, tales como la parafina líquida, podría reducir la biodisponibilidad de los aceites esenciales en agua¹.

El método de fabricación consistió en la dispersión de la fase acuosa sobre la fase oleosa que luego fueron emulsificadas a una temperatura de entre 70 °C y 75 °C. Se incorporó el sistema conservante natural propuesto en la etapa de enfriamiento cuando la emulsión alcance entre 50 °C y 55 °C, mediante agitación constante durante 3 minutos.

Tabla 4. Fórmula cuali-cuantitativa de la emulsión cosmética W/O

(Para una concentración de conservante natural 0,25 %)

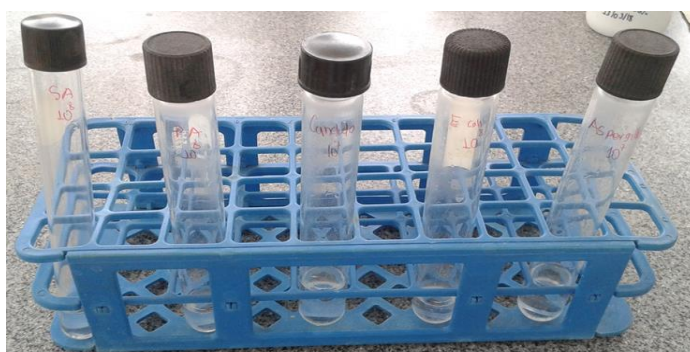
DESCRIPCIÓN	%	Crema W/O con conservante natural 0,25 %	
		CANTIDAD	UND
		100	g
Alcohol estearílico	35,00	35,00	g
Conservante natural	0,25	0,25	g
Propilenglicol	12,00	12,00	g
Sodio lauril sulfato	5,00	5,00	g
Vaselina blanca	25,00	25,00	g
Agua purificada C.S.P.	100,00	100,00	g

Se verificó que el aspecto de las cremas base resultantes fueron estables una vez que alcanzan la temperatura final (temperatura ambiente, aproximadamente 25 °C).

3.7. Evaluación de eficacia conservante (Según norma ISO 11930:2012)

Se evaluó la actividad conservante del sistema natural propuesto, utilizando la prueba de eficacia antimicrobiana, según norma ISO 11930:2012. Se utilizó inóculos estandarizados de las siguientes cepas:

- *Escherichia coli* (ATCC N°. 8739).
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC N°. 9027).
- *Staphylococcus aureus* (ATCC N°. 6538).
- *Candida albicans* (ATCC N°. 10231).
- *Aspergillus niger* (ATCC N°. 16404).

**Figura 7.** Inóculos para la prueba de desafío antimicrobiano

Se realizó el ensayo para cada cepa por separado siguiendo los siguientes pasos:

a) Preparación de la alícuota del producto

Para cada cepa se dispersó 20 g de la fórmula de ensayo en un recipiente estéril.

b) Inoculación de los microorganismos de ensayo

A cada recipiente se le añadió 0,2 mL de inóculo estandarizado. Se mezcló exhaustivamente hasta obtener una distribución homogénea.



Figura 8. Incorporación del inóculo en un frasco con la muestra



Figura 9. Frasco con la muestra e inóculo. Izq-Der. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*

c) Incubación de la fórmula inoculada

Los recipientes que contienen la fórmula inoculada se mantuvieron a una temperatura de $22,5 \pm 2,5$ °C.

d) Muestreo y recuento

El número de microorganismos viables fue medido a los 7, 14 y 28 días. A cada intervalo especificado se tomó 1 g de la fórmula inoculada y se transfirió a 9 mL de neutralizante polisorbato 80 y se mezcló hasta homogeneizar.

En placas Petri de 85 a 100 mm de diámetro, se depositó 1 mL de cada dilución.

Los medios de cultivo utilizados fueron:

- Agar triptona y soya (TSA) para bacterias.
- Agar sabouraud dextrosa (SDA) para *Candida albicans*.
- Agar con patata y dextrosa (PDA) para *Aspergillus niger*.



Figura 10. Dispersión la muestra con espátula de Drigalsky

El valor del logaritmo de la reducción es calculado y comparado con el mínimo valor requerido para el criterio de evaluación A⁴⁹.

Tabla 5. Criterios de evaluación de la norma ISO 11930:2012

Valores requeridos de reducción logarítmica ($Rx = \lg N0 - \lg Nx$) ^a								
Microorganismos	Bacteria			<i>C. albicans</i>			<i>A. niger</i>	
Tiempo de muestreo	T7	T14	T28	T7	T14	T28	T14	T28
Criterio A	≥ 3	≥ 3 y NI ^b	≥ 3 y NI	≥ 1	≥ 1 y NI	≥ 1 y NI	$\geq 0^c$	≥ 1 y NI
Criterio B	No realizado	≥ 3	≥ 3 y NI	No realizado	≥ 1	≥ 1 y NI	≥ 0	≥ 0 y NI

^a En este ensayo se acepta un margen de desviación de 0,5 log

^b NI: no hay incremento en el recuento respecto al del tiempo de contacto precedente.

^c $Rx = 0$ cuando $\lg N0 = \lg Nx$ (No hay incremento respecto al recuento inicial).

Se utilizó el criterio de evaluación A, según el cual, la fórmula está protegida por sí misma frente a la proliferación microbiana, sin considerar ningún otro factor adicional, como por ejemplo el material de empaque o el proceso de fabricación⁵⁰.

3.7.1. Control negativo

Como control negativo se utilizó un placebo, fabricado considerando la misma base de la fórmula, pero sin ningún tipo de conservante.

Tabla 6. Fórmula cuali-cuantitativa del control negativo (placebo)

Descripción	%	Placebo	
		Cantidad 100	Und g
Alcohol cetílico	15,00	15,00	g
Cera espermaceti sintética	5,00	5,00	g
Sodio lauril sulfato	1,00	1,00	g
Agua purificada C.S.P.	100,00	100,00	g

3.7.2. Control positivo

Como control positivo se utilizó un sistema conservante de parabenos (metilparabeno 0,18 % y propilparabeno 0,02 %).

**Tabla 7. Fórmula cuali-cuantitativa del control positivo
(Sistema conservante de parabenos)**

Descripción	%	Crema con parabenos	
		Cantidad 100	Und g
Propilparabeno	0,02	0,02	g
Metilparabeno	0,18	0,18	g
Alcohol cetílico	15,00	15,00	g
Cera espermaceti sintética	5,00	5,00	g
Sodio lauril sulfato	1,00	1,00	g
Agua purificada C.S.P.	100,00	100,00	g

3.8. Evaluación en condiciones de estabilidad

Con el fin de evaluar el desempeño del sistema conservante desarrollado en condiciones de estabilidad, dos emulsiones cosméticas, una O/W y otra W/O con un contenido de 0,25 % del conservante desarrollado, fueron sometidas a condiciones de estabilidad acelerada (40 °C por 6 meses) ⁵¹ en una estufa de laboratorio.

En el tiempo final, del estudio se determinó lo siguiente:

- Especificaciones organolépticas
Se consideró la determinación de aspecto y pH de las emulsiones a fin de verificar que no se presenten cambios significativos.
- Eficacia antimicrobiana (según norma ISO 11930:2012)
Se verificó la capacidad del sistema conservante de ofrecer protección antimicrobiana al final del periodo evaluado.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

4. 1. Caracterización física del conservante natural propuesto

Se obtuvo los siguientes resultados:

- a) Aspecto: líquido amarillo traslúcido de olor característico.



Figura 11. Conservante natural desarrollado

- b) Densidad: 1,030 g/mL
c) Índice de refracción: 1,425
d) Miscibilidad: miscible en medio acuoso.

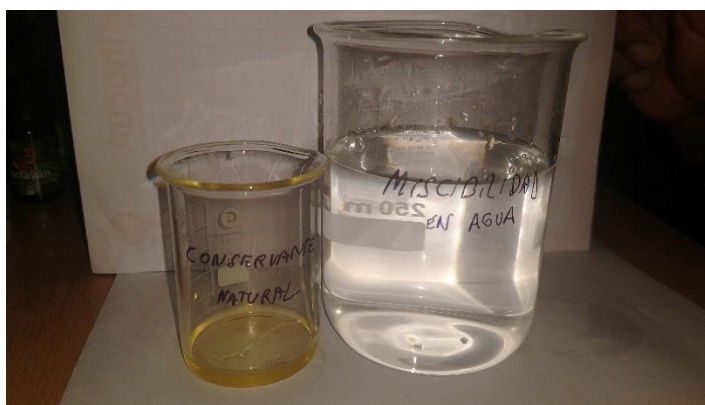


Figura 12. Miscibilidad en medio acuoso

La miscibilidad permite la aplicación del conservante en productos con medio acuoso.

4.2. Actividad antimicrobiana del extracto vegetal y aceites esenciales

Se determinó la actividad antimicrobiana del extracto y de los tres aceites esenciales de forma individual.

Tabla 8. Actividad antimicrobiana del extracto de semillas de *Citrus paradisi* (toronja)

Microorganismos	Muestra				
	Halo de inhibición (mm)			Promedio	DS
<i>Escherichia coli</i>	10	9	10	9,67	0,47
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	10	12	11,67	1,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	9	10	9,67	0,47
<i>Cándida albicans</i>	8	7	8	7,67	0,47
<i>Aspergillus niger</i>	0	0	0	SA	

Control negativo: agua purificada.

SA: sin actividad

El tamaño de los pocillos es de 6 mm. Las medidas reportadas incluyen el tamaño de los pocillos.

Concentración del inóculo: 1×10^8 UFC/mL.

Tabla 9. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Luma chequen* (arrayán)

Microorganismos	Muestra				
	Halo de inhibición (mm)			Promedio	DS
<i>Escherichia coli</i>	12	12	12	12,00	0,00
<i>Staphylococcus aureus</i>	Inhibición total			Inhibición total	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	SA	
<i>Cándida albicans</i>	13	14	13	13,33	0,47
<i>Aspergillus niger</i>	15	15	16	15,33	0,47

Control negativo: agua purificada.

SA: sin actividad

El tamaño de los pocillos es de 6 mm. Las medidas reportadas incluyen el tamaño de los pocillos.

Concentración del inóculo: 1×10^8 UFC/mL.

Tabla 10. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa)

Microorganismos	Muestra				
	Halo de inhibición (mm)			Promedio	DS
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	SA	
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	SA	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	SA	
<i>Cándida albicans</i>	0	0	0	SA	
<i>Aspergillus niger</i>	20	19	20	19.67	0.47

Control negativo: agua purificada.

SA: sin actividad

El tamaño de los pocillos es de 6 mm. Las medidas reportadas incluyen el tamaño de los pocillos.

Concentración del inóculo: 1×10^8 UFC/mL.

Tabla 11. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* (árbol del té)

Microorganismos	Muestra				
	Halo de Inhibición (mm)			Promedio	DS
<i>Escherichia coli</i>	19	18	18	18,33	0,47
<i>Staphylococcus aureus</i>	Inhibición total			Inhibición total	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	SA	
<i>Cándida albicans</i>	23	26	24	24,33	1,25
<i>Aspergillus niger</i>	Inhibición total			Inhibición total	

Control negativo: agua purificada.

SA: sin actividad

El tamaño de los pocillos es de 6 mm. Las medidas reportadas incluyen el tamaño de los pocillos.

Concentración del inóculo: 1×10^8 UFC/mL.

4.3. Actividad antimicrobiana del conservante natural desarrollado:

Se determinó la actividad antimicrobiana del sistema conservante desarrollado.

Tabla 12. Actividad antimicrobiana del sistema conservante desarrollado

Microorganismos	Conservante natural				
	Halo de inhibición (mm)			Promedio	DS
<i>Escherichia coli</i>	13	13	13	13.00	0.00
<i>Staphylococcus aureus</i>	Inhibición total			Inhibición total	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	13	12	12.33	0.47
<i>Cándida albicans</i>	10	10	11	10.33	0.47
<i>Aspergillus niger</i>	26	27	27	26.67	0.47

Control negativo: agua purificada.

SA: sin actividad

El tamaño de los pocillos es de 6 mm. Las medidas reportadas incluyen el tamaño de los pocillos.

Concentración del inóculo: 1×10^8 UFC/mL



Figura 13. Halo de inhibición: *Escherichia coli*



Figura 14. Inhibición total: *Staphylococcus aureus*

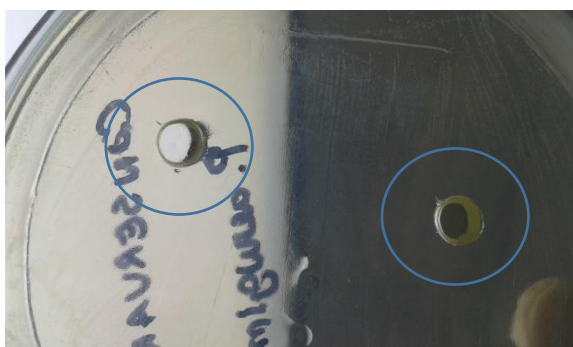


Figura 15. Halo de inhibición: *Pseudomonas aeruginosa*

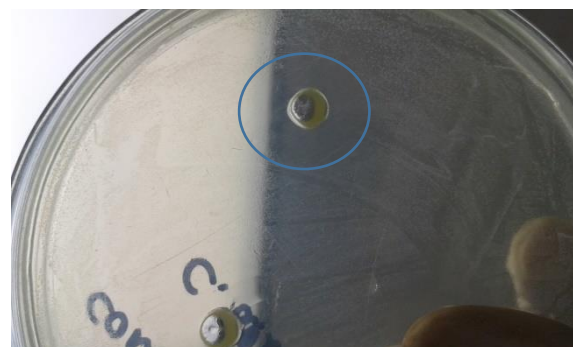


Figura 16. Halo de inhibición: *Candida albicans*

4.4. Eficacia antimicrobiana del control negativo y control positivo

Se evaluó la eficacia del sistema conservante de un control negativo (placebo sin conservantes) y un control positivo (parabenos).

a) Emulsión cosmética sin conservantes (placebo)

Se determinó la eficacia antimicrobiana de una formulación sin ningún conservante, a fin de tener un patrón negativo para comparación.

Tabla 13. Recuento microbiano control negativo

Crema O/W sin conservante (control negativo)					
Microorganismos	Tiempos				
	Día 0	Día 2	Día 7	Día 14	Día 28
	UFC/g (unidades formadoras de colonia por gramo de muestra)				
<i>E. coli</i>	$1,1 \times 10^6$	Incontable >1,12 x 10 ⁶	Incontable >1,12 x 10 ⁶	Incontable >1,12 x 10 ⁶	Incontable >1,12 x 10 ⁶
<i>S. aureus</i>	$1,0 \times 10^6$	Incontable >1,01 x 10 ⁶	Incontable >1,01 x 10 ⁶	Incontable >1,01 x 10 ⁶	Incontable >1,01 x 10 ⁶
<i>P. aeruginosa</i>	$1,7 \times 10^6$	Incontable >1,65 x 10 ⁶	Incontable >1,65 x 10 ⁶	Incontable >1,65 x 10 ⁶	Incontable >1,65 x 10 ⁶
<i>C. albicans</i>	$1,2 \times 10^5$	Incontable >1,24 x 10 ⁵	Incontable >1,24 x 10 ⁵	Incontable >1,24 x 10 ⁵	Incontable >1,24 x 10 ⁵
<i>A. niger</i>	$1,5 \times 10^5$	11	11	13	18

Tabla 14. Reducción logarítmica microbiana control negativo

Crema O/W sin conservante (control negativo)					
Microorganismos	Tiempos				
	Día 0	Día 2	Día 7	Día 14	Día 28
<i>E. coli</i>	-----	0 log	0 log	0 log	0 log
<i>S. aureus</i>	-----	0 log	0 log	0 log	0 log
<i>P. aeruginosa</i>	-----	0 log	0 log	0 log	0 log
<i>C. albicans</i>	-----	0 log	0 log	0 log	0 log
<i>A. niger</i>	-----	4 log	NI	NI	NI

NI: No hubo incremento

b) Emulsión cosmética con parabenos (control positivo)

Se determinó la eficacia antimicrobiana de una formulación con parabenos, a fin de tener un patrón positivo para comparación.

Tabla 15. Recuento microbiano control positivo

Crema O/W con parabenos					
Microorganismos	Tiempos				
	Día 0	Día 2	Día 7	Día 14	Día 28
	UFC/g (unidades formadoras de colonia por gramo de muestra)				
<i>E. coli</i>	$1,1 \times 10^6$	178	Menor a 10	Menor a 10	Menor a 10
<i>S. aureus</i>	$1,0 \times 10^6$	6	Menor a 10	Menor a 10	Menor a 10
<i>P. aeruginosa</i>	$1,7 \times 10^6$	550	Menor a 10	Menor a 10	Menor a 10
<i>C. albicans</i>	$1,2 \times 10^5$	115	Menor a 10	Menor a 10	Menor a 10
<i>A. niger</i>	$1,5 \times 10^5$	13	Menor a 10	Menor a 10	Menor a 10

Tabla 16. Reducción logarítmica microbiana control positivo

Crema O/W con parabenos					
Microorganismos	Tiempos				
	Día 0	Día 2	Día 7	Día 14	Día 28
<i>E. coli</i>	-----	4 log	5 log	NI	NI
<i>S. aureus</i>	-----	5 log	NI	NI	NI
<i>P. aeruginosa</i>	-----	3 log	5 log	NI	NI
<i>C. albicans</i>	-----	3 log	4 log	NI	NI
<i>A. niger</i>	-----	4 log	NI	NI	NI

NI: No hubo incremento

Se observa que la emulsión cosmética con parabenos es eficaz contra la proliferación microbiana.

4.5. Eficacia antimicrobiana del sistema natural propuesto

Se evaluó la eficacia del sistema conservante natural propuesto a tres concentraciones de uso (0,25, 0,5 y 1 %).

a) Emulsión cosmética o/w con conservante natural al 0,25 %

Se determinó la eficacia antimicrobiana de la emulsión cosmética con 0,25 % de conservante natural.

Tabla 17. Recuento microbiano emulsión o/w con conservante natural al 0,25 %

Crema O/W conservante natural al 0,25 %					
Microorganismos	Tiempos				
	Día 0	Día 2	Día 7	Día 14	Día 28
	UFC/g (unidades formadoras de colonia por gramo de muestra)				
<i>E. coli</i>	$1,1 \times 10^6$	30	Menor a 10	Menor a 10	Menor a 10
<i>S. aureus</i>	$1,0 \times 10^6$	45	Menor a 10	Menor a 10	Menor a 10
<i>P. aeruginosa</i>	$1,7 \times 10^6$	35	25	10	10
<i>C. albicans</i>	$1,2 \times 10^5$	15	10	Menor a 10	Menor a 10
<i>A. niger</i>	$1,5 \times 10^5$	Menor a 10	Menor a 10	Menor a 10	Menor a 10

Tabla 18. Reducción logarítmica microbiana emulsión o/w con conservante natural al 0,25 %

Crema O/W conservante natural 0,25 %					
Microorganismos	Tiempos				
	Día 0	Día 2	Día 7	Día 14	Día 28
<i>E. coli</i>	-----	5 log	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i>	-----	4 log	1 log	NI	NI
<i>P. aeruginosa</i>	-----	5 log	NI	NI	NI
<i>C. albicans</i>	-----	4 log	NI	NI	NI
<i>A. niger</i>	-----	4 log	NI	NI	NI

NI: No hubo incremento

b) Emulsión cosmética con conservante natural al 0,5 %

Se determinó la eficacia antimicrobiana de la emulsión cosmética con 0,5 % de conservante natural.

Tabla 19. Recuento microbiano de emulsión o/w con conservante natural al 0,5 %

Crema O/W conservante natural 0,5 %					
Microorganismos	Tiempos				
	Día 0	Día 2	Día 7	Día 14	Día 28
	UFC/g (unidades formadoras de colonia por gramo de muestra)				
<i>E. coli</i>	$1,1 \times 10^6$	40	Menor a 10	Menor a 10	Menor a 10
<i>S. aureus</i>	$1,0 \times 10^6$	Menor a 10	Menor a 10	Menor a 10	Menor a 10
<i>P. aeruginosa</i>	$1,7 \times 10^6$	Menor a 10	10	Menor a 10	Menor a 10
<i>C. albicans</i>	$1,2 \times 10^5$	10	10	Menor a 10	Menor a 10
<i>A. niger</i>	$1,5 \times 10^5$	Menor a 10	Menor a 10	Menor a 10	Menor a 10

Tabla 20. Reducción logarítmica microbiana emulsión o/w con conservante natural al 0,5 %

Crema O/W conservante natural al 0,5 %					
Microorganismos	Tiempos				
	Día 0	Día 2	Día 7	Día 14	Día 28
<i>E. coli</i>	-----	4 log	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i>	-----	5 log	1 log	NI	NI
<i>P. aeruginosa</i>	-----	5 log	NI	NI	NI
<i>C. albicans</i>	-----	4 log	NI	NI	NI
<i>A. niger</i>	-----	4 log	NI	NI	NI

NI: No hubo incremento

c) **Emulsión cosmética con conservante natural al 1,0 %**

Se determinó la eficacia antimicrobiana de la emulsión cosmética con 1,0 % de conservante natural.

Tabla 21. Recuento microbiano de emulsión o/w con conservante natural al 1,0 %

Crema O/W conservante natural al 1 %					
Microorganismos	Tiempos				
	Día 0	Día 2	Día 7	Día 14	Día 28
	UFC/g (unidades formadoras de colonia por gramo de muestra)				
<i>E. coli</i>	$1,1 \times 10^6$	34	Menor a 10	Menor a 10	Menor a 10
<i>S. aureus</i>	$1,0 \times 10^6$	Menor a 10	Menor a 10	Menor a 10	Menor a 10
<i>P. aeruginosa</i>	$1,7 \times 10^6$	3	Menor a 10	Menor a 10	Menor a 10
<i>C. albicans</i>	$1,2 \times 10^5$	55	Menor a 10	Menor a 10	Menor a 10
<i>A. niger</i>	$1,5 \times 10^5$	4	Menor a 10	Menor a 10	Menor a 10

Tabla 22. Reducción logarítmica microbiana emulsión o/w con conservante natural al 1,0 %

Crema O/W conservante natural al 1 %					
Microorganismos	Tiempos				
	Día 0	Día 2	Día 7	Día 14	Día 28
<i>E. coli</i>	-----	5 log	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i>	-----	5 log	NI	NI	NI
<i>P. aeruginosa</i>	-----	5 log	6 log	NI	NI
<i>C. albicans</i>	-----	3 log	4 log	NI	NI
<i>A. niger</i>	-----	4 log	5 log	NI	NI

NI: No hubo incremento

d) Comparación de la inhibición del crecimiento microbiano

Se determinó que las tres concentraciones de conservante natural (0.25; 0.5 y 1,0 %) son capaces de inhibir el crecimiento de cada uno de los microorganismos evaluados.

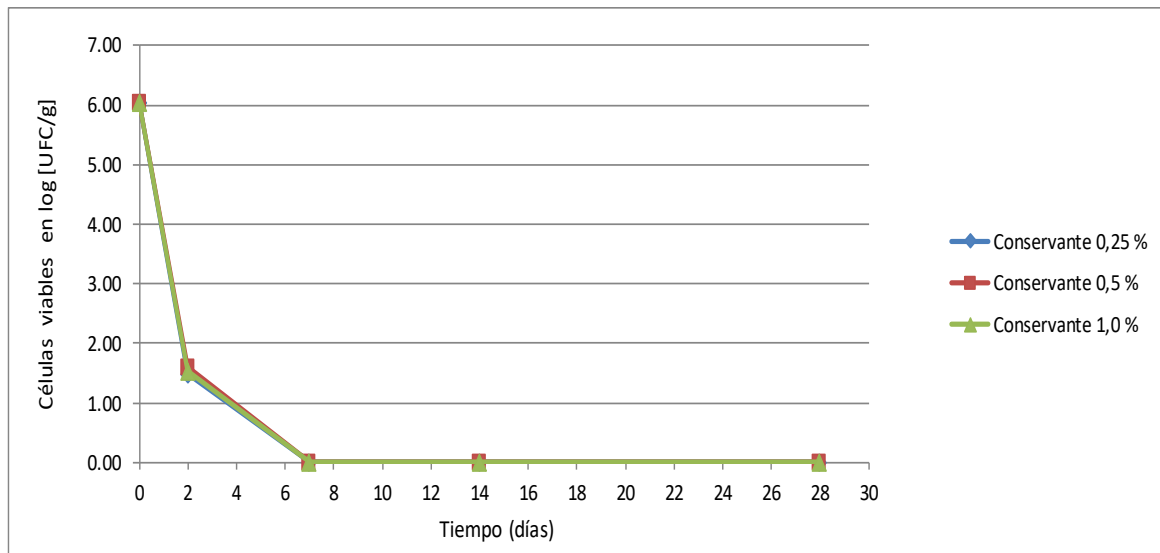


Figura 17. Inhibición del crecimiento *E.coli*

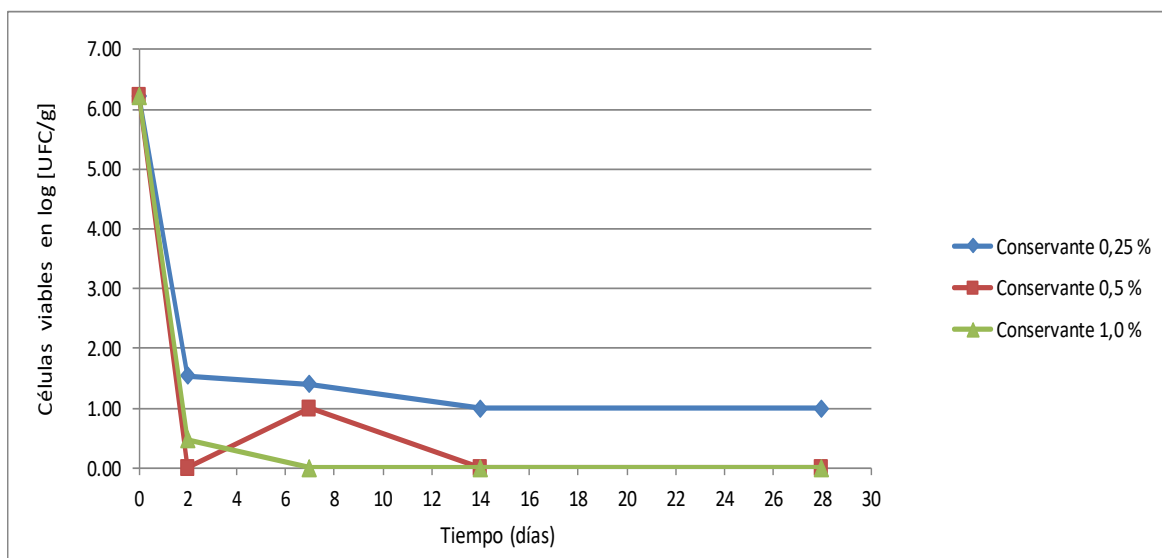


Figura 18. Inhibición del crecimiento *P.aureginosa*

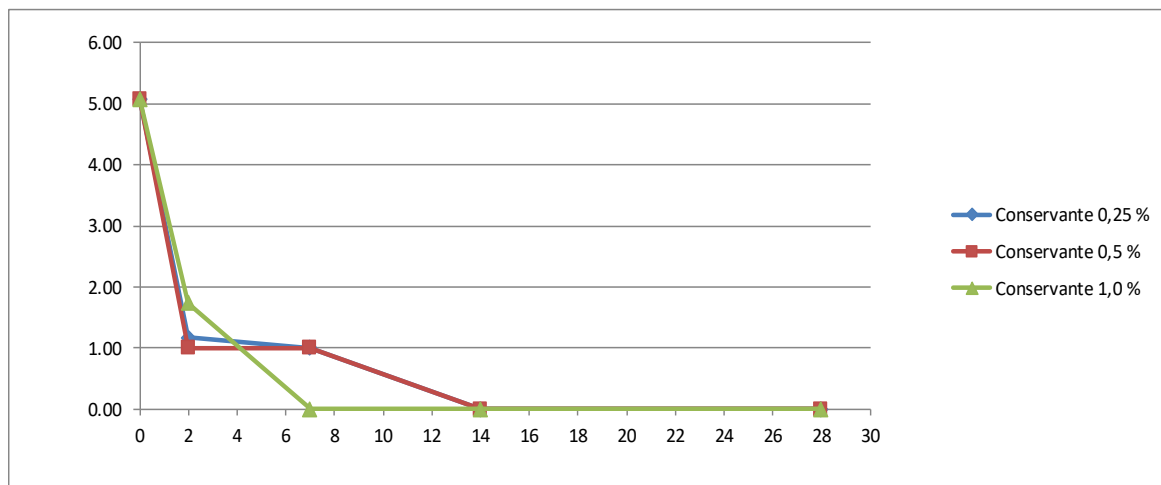


Figura 19. Inhibición del crecimiento *C.albicans*

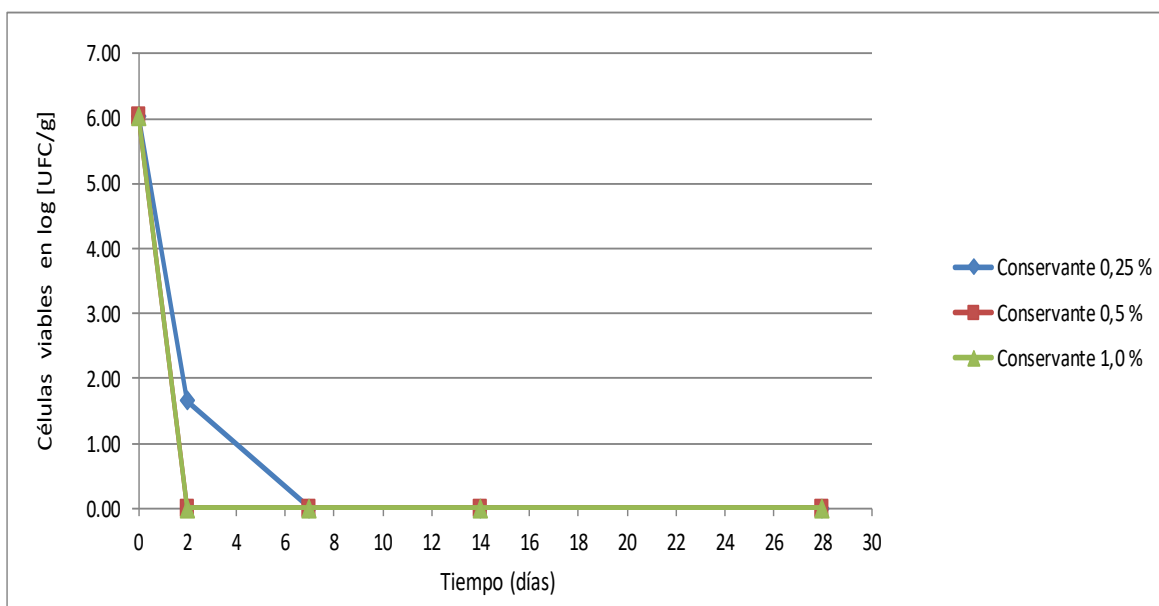


Figura 20. Inhibición del crecimiento *S. aureus*

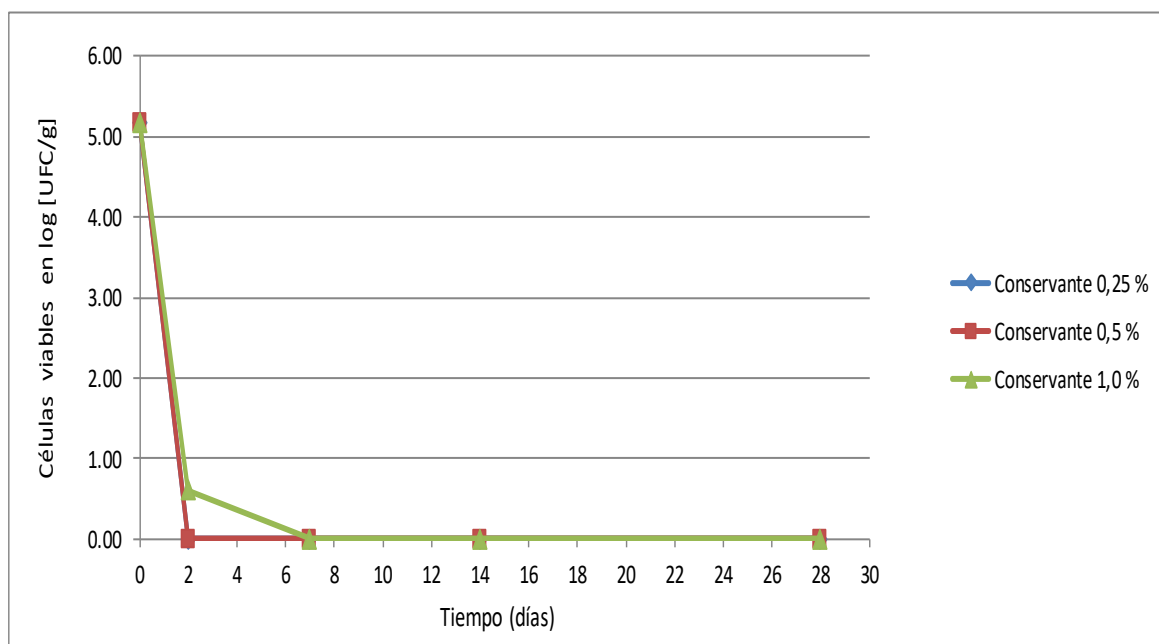


Figura 21. Inhibición del crecimiento *A. niger*

e) **Emulsión cosmética w/o con conservante natural al 0,25 %**

Se determinó la eficacia antimicrobiana de la emulsión cosmética w/o con 0,25 % de conservante natural.

Tabla 23. Recuento microbiano emulsión w/o con conservante natural al 0,25 %

Crema W/O conservante natural al 0,25 %					
Microorganismos	Tiempos				
	Día 0	Día 2	Día 7	Día 14	Día 28
	UFC/g (unidades formadoras de colonia por gramo de muestra)				
<i>E. coli</i>	$1,1 \times 10^6$	Menor a 10	Menor a 10	15	10
<i>S. aureus</i>	$1,0 \times 10^6$	Menor a 10	Menor a 10	Menor a 10	Menor a 10
<i>P. aeruginosa</i>	$1,7 \times 10^6$	Menor a 10	Menor a 10	Menor a 10	Menor a 10
<i>C. albicans</i>	$1,2 \times 10^5$	Menor a 10	Menor a 10	Menor a 10	Menor a 10
<i>A. niger</i>	$1,5 \times 10^5$	Menor a 10	Menor a 10	Menor a 10	Menor a 10

Tabla 24. Reducción logarítmica microbiana emulsión w/o con conservante natural al 0,25 %

Crema W/O conservante natural 0,25 %					
Microorganismos	Tiempos				
	Día 0	Día 2	Día 7	Día 14	Día 28
<i>E. coli</i>	-----	5 log	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i>	-----	5 log	NI	NI	NI
<i>P. aeruginosa</i>	-----	5 log	NI	NI	NI
<i>C. albicans</i>	-----	4 log	NI	NI	NI
<i>A. niger</i>	-----	4 log	NI	NI	NI

NI: No hubo incremento

4.6. Evaluación en condiciones de estabilidad

Los resultados para las dos emulsiones cosméticas (O/W y W/O) con contenido de 0,25 % de conservante natural sometidas a condiciones de estabilidad acelerada (40°C por 6 meses) fueron los siguientes:

a) **Emulsión cosmética O/W conservante natural al 0,25 % (estabilidad)**

Los resultados correspondientes a las características físicas fueron los siguientes:

Tabla 25. Análisis organoléptico en condiciones de estabilidad acelerada.

	Tiempo inicial	Sexto mes
Aspecto	Crema homogénea de color blanco a crema.	Crema homogénea de color blanco a crema.
pH	6,63	6,61

Al sexto mes se realizó la eficacia antimicrobiana bajo el método descrito en la norma ISO 11930: 2012 (tablas 24 y 25).

Tabla 26. Recuento microbiano emulsión o/w con conservante natural al 0,25 % en condiciones de estabilidad

Crema O/W conservante natural al 0,25 % (Estabilidad)					
Microorganismos	Tiempos				
	Día 0	Día 2	Día 7	Día 14	Día 28
	UFC/g (unidades formadoras de colonia por gramo de muestra)				
<i>E. coli</i>	1,1 x 10 ⁶	80	12	Menor a 10	Menor a 10
<i>S. aureus</i>	1,0 x 10 ⁶	14	8	Menor a 10	Menor a 10
<i>P. aeruginosa</i>	1,7 x 10 ⁶	37	10	Menor a 10	Menor a 10
<i>C. albicans</i>	1,2 x 10 ⁵	15	Menor a 10	Menor a 10	Menor a 10
<i>A. niger</i>	1,5 x 10 ⁵	Menor a 10	Menor a 10	Menor a 10	Menor a 10

Tabla 27. Reducción logarítmica microbiana emulsión o/w con conservante natural al 0,25 % en condiciones de estabilidad

Crema O/W Conservante natural 0,25 % (estabilidad)					
Microorganismos	Tiempos				
	Día 0	Día 2	Día 7	Día 14	Día 28
<i>E. coli</i>	-----	4 log	5 log	NI	NI
<i>S. aureus</i>	-----	5 log	NI	NI	NI
<i>P. aeruginosa</i>	-----	5 log	NI	NI	NI
<i>C. albicans</i>	-----	4 log	NI	NI	NI
<i>A. niger</i>	-----	4 log	NI	NI	NI

NI: No hubo incremento

b) Emulsión cosmética W/O conservante natural al 0,25 % (estabilidad)

Los resultados correspondientes a las características físicas fueron los siguientes:

Tabla 28. Análisis organoléptico condiciones de estabilidad acelerada.

	Tiempo inicial	sexto mes
Aspecto	Crema homogénea de color blanco a crema.	Crema homogénea de color blanco a crema.
pH	6,57	6,59

Al sexto mes se realizó la eficacia antimicrobiana bajo el método descrito en la norma ISO 11930: 2012 (tablas 27 y 28).

Tabla 29. Recuento microbiano emulsión W/O con conservante natural al 0,25 % en condiciones de estabilidad

Crema W/O conservante natural al 0,25% (estabilidad)					
Microorganismos	Tiempos				
	Día 0	Día 2	Día 7	Día 14	Día 28
	UFC/g (unidades formadoras de colonia por gramo de muestra)				
<i>E. coli</i>	$1,1 \times 10^6$	12	20	Menor a 10	Menor a 10
<i>S. aureus</i>	$1,0 \times 10^6$	10	10	Menor a 10	Menor a 10
<i>P. aeruginosa</i>	$1,7 \times 10^6$	10	8	Menor a 10	Menor a 10
<i>C. albicans</i>	$1,2 \times 10^5$	25	12	Menor a 10	Menor a 10
<i>A. niger</i>	$1,5 \times 10^5$	13	Menor a 10	Menor a 10	Menor a 10

Tabla 30. Reducción logarítmica microbiana emulsión W/O con conservante natural al 0,25 % en condiciones de estabilidad

Crema W/O conservante natural 0,25% (estabilidad)					
Microorganismos	Tiempos				
	Día 0	Día 2	Día 7	Día 14	Día 28
<i>E. coli</i>	-----	5 log	5 log	NI	NI
<i>S. aureus</i>	-----	5 log	NI	NI	NI
<i>P. aeruginosa</i>	-----	5 log	NI	NI	NI
<i>C. albicans</i>	-----	4 log	NI	NI	NI
<i>A. niger</i>	-----	4 log	NI	NI	NI

NI: No hubo incremento

CAPÍTULO 5. DISCUSION

El extracto vegetal y los tres aceites esenciales, de forma individual presentan actividad antimicrobiana frente a algunos de los microorganismos evaluados (tablas 8, 9, 10 y 11); sin embargo, ninguna de estas muestras presenta actividad frente a todos, lo cual nos indica que presentan espectro limitado; por lo que no podrían ser utilizados como conservante único en una formulación (tabla 31).

Tabla 31. Resumen de actividad antimicrobiana individual de los componentes

Extracto o aceite esencial	Halo de inhibición (mm)				
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
<i>Citrus paradisi</i>	9,67 ± 0,47	11,67 ± 1,25	9,67 ± 0,47	7,67 ± 0,47	SA
<i>Luma chequen</i>	12,00 ± 0,00	Inhibición total	SA	13,33 ± 0,47	15,33 ± 0,47
<i>Cymbopogon citratus</i>	SA	SA	SA	SA	19,67 ± 0,47
<i>Melaleuca alternifolia</i>	18,33 ± 0,47	Inhibición total	SA	24,33 ± 1,25	Inhibición total

• SA: sin actividad

La actividad del extracto de *Citrus paradisi* se encuentra determinada por su contenido de polifenoles y flavonoides²⁴; sin embargo, el extracto de *Citrus paradisi*, no presentó actividad frente a *Aspergillus niger*. Esto se corresponde con los hallazgos de otros estudios, en los cuales se encuentra una baja actividad de derivados de *Citrus paradisi*, frente a dicho microorganismo^{14,43}.

El aceite esencial de *Cymbopogon citratus*, presentó una importante actividad frente a *Aspergillus niger*. Esto se relaciona con lo señalado en estudios referidos a su actividad antifúngica^{10,12}. La actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* se relaciona con su contenido de monoterpenos, sesquiterpenos y terpenoides^{6,29}.

El aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* posee actividad antimicrobiana principalmente relacionada con su contenido de terpenoides oxigenados (ej.: 1,8 Cineol); sin embargo, El aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* no presentó actividad frente a *Pseudomonas aureginosa*. Esto es similar a lo referido por Cox, en su estudio referido a dicho aceite esencial³³.

La actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Luma chequen* se encuentra relacionada con sus compuestos fenólicos¹⁰ y con compuestos pertenecientes al grupo de los monoterpenos (principalmente α -pineno y β -pineno) y sesquiterpenos^{26,28}.

La menor sensibilidad “*in vitro*” de *Pseudomonas aeruginosa*, frente a los aceites esenciales evaluados individualmente, se explica porque es un microorganismo resistente a un gran número de antibióticos gracias a diversos mecanismos de resistencia, entre estos: las bombas de expulsión y su excepcional impermeabilidad de la membrana celular. Este microorganismo es conocido por ser muy persistente y predominante en contaminaciones microbiológicas en productos farmacéuticos y cosméticos^{29,37}. Además, generalmente las bacterias gramnegativas son menos susceptibles a los aceites esenciales que las grampositivas. La membrana externa de las bacterias gramnegativas contiene lipopolisacáridos hidrofílicos, que proveen mayor tolerancia a compuestos antimicrobianos hidrofóbicos^{9,12,19}. La limitación de la actividad de los aceites esenciales puede ser explicada, además, por la baja miscibilidad en agua del aceite y de sus componentes, lo cual adicionalmente es una limitación para la aplicación del método de difusión en disco⁹; por lo cual, en esta investigación, se aplicó el método de difusión en pocillos.

Se observa que el sistema conservante natural propuesto, presenta actividad antimicrobiana frente a todos los microorganismos evaluados (tabla 12), lo cual nos indica que el espectro de este conservante es más amplio que el extracto y los aceites esenciales individuales, actuando frente a todos los microorganismos evaluados. La incorporación del extracto etanólico de semillas de *Citrus paradisi* (toronja), como componente del conservante desarrollado, mejora el desempeño del sistema conservante; inclusive, la actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa*, se ve incrementada, con referencia a la actividad que presenta el extracto de *Citrus paradisi*, de forma individual. Adicionalmente contribuye a la estabilidad del conservante natural desarrollado, prolongando su periodo de vida útil, gracias a su capacidad antioxidante^{22,52}.

Un aspecto sobre el que actualmente existen pocos estudios es la concentración de uso de los conservantes; que debe ser la menor posible, para reducir los posibles efectos adversos³. Un caso referencial es el del aceite esencial de *Thymus vulgaris*, que se ha evaluado en 3 % de uso como conservante en formulaciones tópicas. Otros aceites

esenciales, incorporados entre 1 a 25 % en ungüentos, han sido utilizados para el tratamiento tópico de infecciones por dermatofitos³⁷. De acuerdo con los criterios de evaluación indicados en la ISO 11930:2012, el sistema conservante natural en el rango de concentración entre 0,25 y 1,00 % es eficaz contra la proliferación microbiana en una emulsión O/W (tablas 17,18,19,20,21 y 22). También es eficaz a una concentración de 0,25 % en una emulsión W/O (tablas 23 y 24). Por lo tanto, su aplicación es factible en ambos tipos de emulsiones.

Al realizar una comparación de la inhibición del crecimiento microbiano para las tres concentraciones evaluadas del conservante natural, se observa que en el caso de *Escherichia coli*, no hay diferencia en la acción de las tres concentraciones (figura 20). Para el caso de *Pseudomonas aureginosa* se encontró diferencia en la acción de las tres concentraciones, siendo la de 0,25 % la de menor poder inhibitorio (figura 21). Para el caso de *Candida albicans* se observa diferencia en la acción de las tres concentraciones, siendo las concentraciones de 0,25 y 0,50 % las de menor poder inhibitorio (figura 22). Para el caso de *Staphylococcus aureus* se encontró diferencia en la acción de las tres concentraciones, siendo la de 0,25 % la de menor poder inhibitorio (figura 23). Para el caso de *Aspergillus niger* también hay diferencia en la acción de las tres concentraciones, siendo las de 0,25 y 0,50 % las de menor poder inhibitorio (figura 24).

En condiciones de estabilidad, de acuerdo con los criterios de evaluación indicados en la ISO 11930:2012, el sistema conservante del producto, a una concentración de 0,25 %, es eficaz contra la proliferación microbiana, tanto para la emulsión O/W como para la emulsión W/O (tablas 26,27,29 y 30).

Se observa además que una emulsión cosmética sin conservantes (placebo) no es eficaz contra la proliferación microbiana (tablas 13 y 14). El uso de un control negativo permite descartar protección antimicrobiana relacionada con características propias de la fórmula (excipientes) y el proceso de fabricación.

Se utilizó la norma ISO 11930:2012 como referencia, por ser el criterio más apropiado para productos cosméticos, a fin de tener un método estandarizado y poder compararlo con estudios similares³⁷. Se seleccionó el criterio de decisión de producto tipo A, para evaluar la eficacia del sistema conservante natural desarrollado de manera

independiente a factores adicionales, tales como el diseño del envase⁴⁹. La norma ISO 11930:2012 ha sido recientemente reemplazada por la segunda edición, norma ISO 11930:2019; sin embargo, se mantienen los criterios de evaluación. El principal cambio es la consideración de dos tipos de diluyentes para el caso del inóculo de *Candida albicans*⁴⁹.

Se puede ampliar el alcance de esta investigación, considerando aceites esenciales de otras especies vegetales. Además, se puede evaluar la optimización del efecto conservante mediante la aplicación de técnicas como la microencapsulación⁵². El desarrollo de nanopartículas con aceites esenciales también puede incrementar su efecto antimicrobiano, previniendo o retardando reacciones de termo-oxidación, dándole, por lo tanto, mayor estabilidad. También se puede desarrollar nanoemulsiones que facilitan la dispersabilidad y mejoran la actividad antimicrobiana del conservante⁶.

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

- 1) El sistema desarrollado con base en un extracto natural y tres aceites esenciales, posee actividad como conservante, en el rango de 0,25 % a 1 %, por lo cual puede presentarse como una alternativa a los parabenos.
- 2) Se formularon dos emulsiones cosméticas O/W y W/O incluyendo un extracto natural y tres aceites esenciales sin modificar de manera significativa las características de la crema base utilizada, lo cual demuestra su compatibilidad.
- 3) Una formulación con 0,25 % del conservante natural propuesto, de manera similar a una formulación con parabenos, brinda protección eficaz a la formulación frente a contaminación microbiológica, según los criterios de la norma ISO 11930:2012.
- 4) La actividad del sistema conservante propuesto es estable en condiciones de estabilidad acelerada (40 °C por seis meses).

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nostro A, Cannatelli MA, Morelli I, Musolino AD, Scuderi F, Pizzimenti F, *et al.* Efficiency of *Calamintha officinalis* essential oil as preservative in two topical product types. J Appl Microbiol. 2004;97(2):395–401.
2. Ladu G, Cubaiu L, d Hallewin G, Pintore G, Petretto GL. *Rosmarinus officinalis* L. and *Myrtus communis* L. Essential oils treatments by vapor contact to control *Penicillium digitatum*. J Food Process Technol. 2015;06(09).
3. Lalitha Ch. Rao P. Antimicrobial efficacy of low level cosmetic preservatives. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science [Internet]. 2014 [citado 25 abr 2016];3(2):1685–96. Disponible en: <http://www.wjpps.com/download/article/1391271639.pdf>
4. Kirchoff M, Gannes G De. The health controversie of parabens. Skin therapy lett [Internet]. 2013 [citado 25 abr 2016];1–8. Disponible en: http://www.medscape.com/viewarticle/780590_7
5. Strole A. Cosmetica Casera 150 sencillas recetas de belleza a partir de ingredientes naturales. 1º Edición. Urano, editor. Barcelona; 2015. 23-76.
6. Chouhan S, Sharma K, Guleria S. Antimicrobial activity of some essential oils present status and future perspectives. Medicines. 2017;4(4):58.
7. Sheskey PJ, Cook WG, Cable CG. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Eighth Edi. Press P, editor. Washington; 2017.
8. Varvaresou A, Papageorgiou S, Tsirivas E *et al.* Self-preserving cosmetics. International Journal of Cosmetic Science [Internet]. 2009 [citado 25 abr 2016];31(3):163–75. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1468-2494.2009.004292.x>
9. Sokovic M, Glamočlija J, Marin PD *et al.* Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an *in vitro* model. Molecules. 2010;15(11):7532–46.
10. Tabassum N, Vidyasagar G. Antifungal investigations on plant essential oils. A review. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science [Internet]. 2013 [citado 26 abr 2016];5(2):19–28. Disponible en: http://www.jonnsaromatherapy.com/pdf/Tabassum_Antigungal_Plant_Essential_Oils_2013.pdf
11. Papageorgiou S, Varvaresou A, Tsirivas E, Demetzos C. New alternatives to cosmetics preservation. J Cosmet Sci. 2010;61(2):107–23.
12. Pandey A, Kumar P, Singh P *et al.* Essential oils: sources of antimicrobials and food preservatives. Frontiers in microbiology. 2016;7:2161.
13. Swamy M, Akhtar M, Sinniah U. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. Evidence-based complementary and alternative medicine. 2016;2016(October).

14. Okunowo W, Oyedeji O, Afolabi L, Matanmi E. Essential oil of grape fruit (*Citrus paradisi*) peels and its antimicrobial activities. American journal of plant science. 2013;04(07):1–9.
15. Gonzales P, Mansilla A, Rengifo L. Extracción de aceite esencial de *Myrtus communis* L. Estudio de su actividad antimicrobiana. Universidad Agraria de La Molina. Departamento de química. Peruvian Green Chemistry [Internet]. 2014 [citado 25 abr 2016];1–34. Disponible en: http://www.lamolina.edu.pe/facultad/ciencias/dquimica/pergreenchemistry/?page_id=49
16. Ruiz C, Díaz C, Rojas R. Composición química de aceites esenciales de 10 plantas aromáticas peruanas. Revista la Sociedad Química del Perú. 2015;81(2):81–94.
17. Dreger M, Wielgus K. Application of essential oils as natural cosmetic preservatives. Herba Polonica [Internet]. 2013 [citado 28 abr 2016];59(4):142–56. Disponible en: <http://www.herbapolonica.pl/magazines-files/7762075-Dreger%20and%20Wielgus.pdf>
18. Pawar H, Shenoy A, Narawade P, Soni P, Shanbhag P. Preservatives from nature : a review. International Journal of Pharmaceutical Phytopharmacological Research. 2011;1(2):78–88.
19. Vasek O, Cáceres L, Chamorro E, Velasco G. Antibacterial activity of *Citrus paradisi* essential oil. Journal of Natural Products [Internet]. 2015 [citado 29 abr 2016];8:16–26. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/277670234_antibacterial_activity_of_citrus_paradisi_esetial_oil
20. Fahimi S, Hajimehdipoor H, Shabanpoor H, Bagheri F, Shekarchi M. Synergic antibacterial activity of some essential oils from lamiaceae. Research Journal of Pharmacognosy. 2015;2(3):23–9.
21. Caldecott T. Grapefruit Seed Extract. Medical Herbalism [Internet]. 2005 [citado 04 may 2016];14(3):1–2. Disponible en: <http://medherb.com/eletter/GSE-Caldecott.pdf>
22. Faleye F, Oundaini A, Olugbade A. Antibacterial and antioxidant activities of *Citrus paradisi* (grapefruit seed) extracts. Research Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation [Internet]. 2012 [citado 09 may 2016];1(3):63–6. Disponible en: http://jpsionline.com/admin/php/uploads/68_pdf.pdf
23. Takeoka G, Dao L, Wong R, Harden L. Identification of benzalkonium chloride in commercial grapefruit seed extracts. J Agric Food Chem. 2001;49(7):3316–20.
24. Cvetnić Z, Vladimir-Knežević S. Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract. Acta Pharm. 2004;54(3):243–50.
25. Al-Âni W, Tawfik N, Shehab E. Antimicrobial activity of grapefruit seeds extracts (*in vitro* study). Al-Rafidain Dent J [Internet]. 2011 [citado 09 may 2016];11(2):341–5. Disponible en: <http://rafidaindentj.net/index.php/rdj/article/view/350>
26. Gonçalves M, Cavaleiro C, Da Cunha A, Salgueiro L. Chemical composition and

- antimicrobial activity of the commercially available oil of *Luma chequen* (Molina) A. Gray. Journal of Essential Oil Research. 2006;18(1):108–10.
27. Torres-Chatí J, León-Quispe J, Tomás-Chota G. Actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” frente a patógenos de origen clínico. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 2017;37(1):10–6.
 28. Moina V. Actividad antibacteriana *in vitro* de colutorios elaborados con aceites esenciales de *Luma chequen* (Feuilleé ex Molina) A.Gray “arrayán” y *Minthostachys spicata* (Benth). Epling “yuraq muña” frente a la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Universidad Nacional de San Antonio de Abad del Cuzco; 2015.
 29. Akhila A. Essential oil – bearing grasses, the genus *Cymbopogon*. Press C, editor. 2010. 25 – 183 p.
 30. Alzamora L, Morales L, Armas L, Fernández G. Medicina Tradicional en el Perú: Actividad antimicrobiana *in vitro* de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. Anales de la Facultad de Medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2001. 62(2):156-61.
 31. Carson C, Hammer K, Riley T. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. Clinical Microbiology Reviews. 2006;19(1):50–62.
 32. Cox S, Mann C, Markham J, Bell H, Gustafson J, Warmington J, *et al.* The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). Journal of Applied Microbiology. 2000;88(1):170–5.
 33. Cox S, Mann C, Markham J. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. Journal of Applied Microbiology. 2001;91(3):492–7.
 34. Terzi V, Morcia C, Faccioli P, Valè G, Tacconi G, Malnati M. *In vitro* antifungal activity of the tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil and its major components against plant pathogens. Letters in Applied Microbiology. 2007;44(6):613–8.
 35. Siegert W. Comparison of microbial challenge testing methods for cosmetics. Househ Pers Care Today. 2013;8(2):32–9.
 36. Asociación Española de Normalización y Certificación A. Norma española ensayo de la protección antimicrobiana de un producto cosmético. UNE-EN ISO 11930. 84 CTA, editor. Madrid; 2014.
 37. Manou I, Bouillard L, Devleeschouwer M, Barel A. Evaluation of the preservative properties of *Thymus vulgaris* essential oil in topically applied formulations under a challenge test. J Appl Microbiol. 1998;84(3):368–76.
 38. Siegert W. ISO 11930 - A Comparison to other Methods to Evaluate the Efficacy of Antimicrobial Preservation. SOFW-Journal. 2012;138(7):44.
 49. USP 42. Farmacopea de la Estados Unidos de América. Rockville; 2019: 7648.

40. Kuklinski C. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Omega E, editor, 2003.
41. Baser K. Handbook of essential oils : science, technology, and applications. Second Edi. Group. CPT& F, editor, 2016.
42. Hernandez-Sampieri R, Mendoza C. Metodología de la investigación las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta. 1º Edición. Ciudad de México: Education, McGraw Hill; 2018: 161.
43. Oikeh E, Omoregie E, Oviasogie F, Oriakhi K. Phytochemical, antimicrobial, and antioxidant activities of different citrus juice concentrates. Food Science and Nutrition. 2016;4(1):103–9.
44. Carhuapoma M, Bonilla P, Suarez S, Vila R, López S. Estudio de la composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de *Luma chequen* (Moliná) A. Gray “arrayán.” Ciencia e Investigación. 2005;8(2):73–9.
45. Cabrera C. Actividad antimicrobiana de un sistema a base de un extracto vegetal y tres aceites esenciales. Ciencia e Investigación. 2019;22(1):21–6.
46. Vukovic N, Milosevic T, Sukdolak S, Solujic S. Antimicrobial activities of essential oil and methanol extract of *Teucrium montanum*. Evidence-based complement Altern Med. 2007;4:17–20.
47. Şerban E, Ionescu M, Matinca D, Maier C, Bojiţă M. Screening of the antibacterial and antifungal activity of eight volatile essential oils. Farmacia. 2011;59(3):440–6.
48. Mith H, Duré R, Delcenserie V *et al.* Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. Food Science and Nutrition [Internet]. 2014 [citado 12 may 2016];2(4):403–16. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/fsn3.116>
49. International Organization for Standardization. International Standard ISO 11930:2019, Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product. Second Edi. Ginebra; 2019.
50. INACAL. NTP-ISO 11930: 2016. Cosméticos . Microbiología . Evaluación de la protección antimicrobiana de un producto cosmético. 1ra Edición. INACAL, editor. Lima; 2016.
51. ANVISA. Serie Calidad en Cosméticos Guía de Estabilidad de Productos Cosméticos. 1º Edición. Brasilia: Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria; 2005: 19–21.
52. Gortzi O, Lalas S, Chinou I, Tsaknis J. Reevaluation of bioactivity and antioxidant activity of *Myrtus communis* extract before and after encapsulation in liposomes. Eur Food Res Technol. 2008;226(3):583–90.

8. ANEXOS

Anexo 1. Certificado de análisis del extracto de semilla de *Citrus paradisi*



CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product: NutriBiotic GSE Liquid Part# 1000 Lot# 01916

Manufacture Date 01/2016 Expiration Date 01/2021

Analysis	Test Method	Specifications	Results
TPC	USP <61&62> Modified	<100cfu/g	<100cfu/gm
Yeast/Mold	USP <61&62> Modified	<100cfu/g	<100cfu/gm
Coliforms	USP <61&62> Modified	<10cfu/g	<10cfu/g
E. Coli	USP <61&62> Modified	Negative	Negative
S. aureus	USP <61&62> Modified	Negative	Negative
Pseudomoas	USP <61&62> Modified	Negative	Negative
Salmonella/Shigella	USP <61&62> Modified	Negative	Negative
Identification	FTIR	Pass <95.0%	Pass
Vitamin C	By Titration	0.5% - 1.0%	0.80%
pH	MQLTM-0039	3.0 – 4.0	3.7
Mercury*	AOAC 993.14 & 999.10	<0.5ppm	<0.5ppm
Lead*	AOAC 993.14 & 999.10	<0.5ppm	<0.5ppm
Arsenic*	AOAC 993.14 & 999.10	<0.5ppm	<0.5ppm
Cadmium*	AOAC 993.14 & 999.10	<0.5ppm	<0.5ppm
Appearance	Visual	Viscous Liquid	Conforms to Standard
Color	Visual	Slightly Amber	Conforms to Standard

* Data acquired from random lot testing

Approved By:  Q.A. Date: 2/16/16

Anexo 2. Ficha técnica del aceite esencial de *Luma chequen*



FICHA TÉCNICA

PRODUCTO : ACEITE ESENCIAL DE ARRAYAN

CAS : 8007-88-09

NOMBRE CIENTIFICO : *Luma chequen*

EMPRESA : AROMATICA Y CULINARIA SAC

ORIGEN : CUZCO

METODO DE PRODUCCIÓN : POR ARRASTRE AL VAPOR

PARTE USADA : HOJAS

PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS

APARIENCIA : LIQUIDO CLARO AMARILLENTO

OLOR : NOTA MEDIA CON AROMA DULCE Y HERBACEO

PROPIEDADES FÍSICO QUÍMICAS

-PRINCIPALES COMPONENTES :

Alfa-Pineno (hidrocarburos monoterpénicos)	57.30%
Beta-Pineno (hidrocarburos monoterpénicos)	6.20%
Otros Hidrocarburos Monoterpénicos	4.70%

- **DENSIDAD ESPECÍFICA** : 0.9044 g/mL

- **INDICE DE REFRACCIÓN** : 1.470

- **ÍNDICE DE ACIDEZ (mg KOH/g)** : Máximo 1

- **ALMACENAMIENTO** : MANTENER EL RECIPIENTE BIEN CERRADO, EN LUGAR FRESCO Y AIREADO Y DE PREFERENCIA OSCURO

FECHA DE EXPIRACIÓN : EN BUENAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO 24 MESES DESPUES DE LA FABRICACIÓN

ENVASE : FRASCO DE VIDRIO ÁMBAR TIPO III

Anexo 3. Ficha técnica del aceite esencial de *Melaleuca alternifolia*



FICHA TÉCNICA

PRODUCTO : ACEITE ESENCIAL DE ARBOL DEL TE

CAS : 8006-87-10

NOMBRE CIENTIFICO : *Melaleuca Alternifolia*

EMPRESA : AROMATICA Y CULINARIA SAC

ORIGEN : AUSTRALIA

METODO DE PRODUCCIÓN : POR ARRASTRE AL vapor

PARTE USADA : HOJAS

PROPIEDADES ORGANOLÈPTICAS

APARIENCIA : LIQUIDO INCOLORO A AMARILLO CLARO

OLOR : NOTA MEDIA CON AROMA HERBAL Y REMEDIO

PROPIEDADES FÍSICO QUIMICAS

-PRINCIPALES COMPONENTES : Terpinen-4-ol: 42.27%, 1,8 Cineol: 2.39%

- DENSIDAD ESPECÍFICA (21°C) : 0.72524

- INDICE DE REFRACCIÓN : 1.2754

- ÍNDICE DE ACIDEZ (mg KOH/g) : Máximo 1

- ALMACENAMIENTO : MANTENER EL RECIPIENTE BIEN CERRADO, EN LUGAR FRESCO Y AIREADO Y DE PREFERENCIA OSCURO

FECHA DE EXPIRACIÓN : EN BUENAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO 24 MESES DESPUES DE LA FABRICACIÓN

ENVASE : FRASCO DE VIDRIO ÁMBAR TIPO III

Anexo 4. Ficha técnica del aceite esencial de *Cymbopogon citratus*



FICHA TÉCNICA

ACEITE ESENCIAL DE HIERBA LUISA

Proveedor : Aromatica y Culinaria SAC - IKARO

1. Descripción: El aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) es un producto obtenido de las hojas y tallos por medio de una destilación por arrastre de vapor. Se trata de un aceite esencial totalmente natural sin aditivos químicos.

2. Aplicaciones Ingrediente natural para cosméticos.

3. Especificaciones : *Cymbopogon citratus*

4. Propiedades Organolepticas

Aspecto Líquido

Color amarillo claro a amarillo

Olor cítrico terpénico

Punto inflamación: 48°C

Riqueza (% GC) : Citral > 75 %

5. Propiedades Físico Químicas

Densidad (20°C) : 0,875 - 0,920

Índice refracción (20°C): 1,4650 - 1,4850

Método Interno Solubilidad en alcohol: Completamente soluble en alcohol 96° (Método Interno)

Parte de la planta utilizada Hojas y tallo.

6. Vida Útil: 24 meses a partir de la fecha de producción. Al final del periodo de caducidad es aconsejable reanalizar el lote, si el lote cumple con los parámetros de calidad se puede seguir utilizando el producto.

7. Descripción de la Planta: La Hierba Luisa es una planta herbácea perenne que pertenece a la familia de las Graminaceae, género *Cymbopogon* y especie *citratus*. La planta produce espesas hojas, éstas son lineares, erguidas cuando jóvenes y pendientes cuando son viejas, cada una es larga hasta 0.70 m y tiene 2.5 cm de ancho. El color de la planta puede variar mucho en función de las condiciones ambientales. La planta florece raramente durante el verano y las flores son espigas muy pequeñas, entonces la propagación se actúa por división de las raíces.

8. Condiciones de Almacenamiento: Asegure buena ventilación, protéjase de la exposición directa a la luz. Manténgase alejado de las Fuentes de ignición. No fumar. Manténgase en contenedores estrechamente sellados y en lugar seco y ventilado.

9. Estándares de Empaque el producto es empacado en botellas de vidrio ámbar tipo III de 11 mL.



Anexo 5. Protocolo de análisis de actividad antimicrobiana del extracto de semilla de *Citrus paradisi*



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA

CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00422-CPF-2017

ORDEN DE ANÁLISIS : 04630/2017

SOLICITADO POR : CARLOS ENRIQUE CABRERA GARCÍA

MUESTRA : NUTRIBIOTIC GSE

NÚMERO DE LOTE : -----

CANTIDAD : 1 frasco x 59 ml

FECHA DE RECEPCIÓN : 24 de Noviembre del 2017

FECHA DE FABRICACIÓN : -----

FECHA DE VENCIMIENTO : -----

MICROORGANISMOS	CONTROL	MUESTRA		
	HALO DE INHIBICIÓN (mm)	HALO DE INHIBICIÓN (mm)		
<i>Escherichia coli</i>	/	100%		
		10	9	10
<i>Staphylococcus aureus</i>		100%		
		13	10	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		100%		
		10	9	10
<i>Candida albicans</i>		100%		
		8	7	8
<i>Aspergillus niger</i>		100%		
		0	0	0

Lima, 11 de Diciembre del 2017




Dra. María Elena Salazar Salvatierra
Directora (e) del Centro de Control Analítico

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú

☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1

E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>




Anexo 6. Protocolo de análisis de actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Luma chequen*



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA

CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00424-CPF-2017

ORDEN DE ANÁLISIS : 04631/2017

SOLICITADO POR : CARLOS ENRIQUE CABRERA GARCÍA

MUESTRA : ARRAYÁN

NÚMERO DE LOTE : -----

CANTIDAD : 1 frasco x 11 ml

FECHA DE RECEPCIÓN : 24 de Noviembre del 2017

FECHA DE FABRICACIÓN : -----

FECHA DE VENCIMIENTO : -----

MICROORGANISMOS	CONTROL	MUESTRA		
	HALO DE INHIBICIÓN (mm)	HALO DE INHIBICIÓN (mm)		
<i>Escherichia coli</i>	/	100%		
		12	12	12
<i>Staphylococcus aureus</i>		100%		
		Inhibición Total		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		100%		
		0	0	0
<i>Candida albicans</i>		100%		
		13	14	13
<i>Aspergillus niger</i>		100%		
		15	15	16

Lima, 11 de Diciembre del 2017



Dra. María Elena Salazar Salvatierra
Directora (e) del Centro de Control Analítico



"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"


Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú

☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1

E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe http://farmacia.unmsm.edu.pe





Anexo 7. Protocolo de análisis de actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Melaleuca alternifolia*



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA

CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00425-CPF-2017

ORDEN DE ANÁLISIS : 04633/2017

SOLICITADO POR : CARLOS ENRIQUE CABRERA GARCÍA

MUESTRA : **ARBOL DE TÉ**

NÚMERO DE LOTE : -----

CANTIDAD : 1 frasco x 11 ml



FECHA DE RECEPCIÓN : 24 de Noviembre del 2017

FECHA DE FABRICACIÓN : -----

FECHA DE VENCIMIENTO : -----

MICROORGANISMOS	CONTROL	MUESTRA		
	HALO DE INHIBICIÓN (mm)	HALO DE INHIBICIÓN (mm)		
<i>Escherichia coli</i>	/	100%		
		19	18	18
<i>Staphylococcus aureus</i>		100%		
		Inhibición Total		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		100%		
		0	0	0
<i>Candida albicans</i>		100%		
		23	26	24
<i>Aspergillus niger</i>		100%		
		Inhibición Total		



Lima, 11 de Diciembre del 2017

Dra. María Elena Salazar Salvatierra
Directora (e) del Centro de Control Analítico

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Av. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
 T: (511) 619-7000 anexo 4824 Ap. Postal 4559 - Lima 1
 E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe http://farmacia.unmsm.edu.pe

Anexo 8. Protocolo de análisis de actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Cymbopogon citratus*



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA

CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00423-CPF-2017

ORDEN DE ANÁLISIS	: 04632/2017
SOLICITADO POR	: CARLOS ENRIQUE CABRERA GARCÍA
MUESTRA	: HIERBA LUISA
NÚMERO DE LOTE	: -----
CANTIDAD	: 1 frasco x 11 ml
FECHA DE RECEPCIÓN	: 24 de Noviembre del 2017
FECHA DE FABRICACIÓN	: -----
FECHA DE VENCIMIENTO	: -----

MICROORGANISMOS	CONTROL	MUESTRA		
	HALO DE INHIBICIÓN (mm)	HALO DE INHIBICIÓN (mm)		
<i>Escherichia coli</i>	/	100%		
		0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>		100%		
		0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		100%		
		0	0	0
<i>Candida albicans</i>	/	100%		
		0	0	0
<i>Aspergillus niger</i>		100%		
		20	19	20

Lima, 11 de Diciembre del 2017



Dra. María Elena Salazar Salvaterra
Directora (e) del Centro de Control Analítico




"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
 ☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1
 E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe http://farmacia.unmsm.edu.pe







Anexo 9. Protocolo de análisis de actividad antimicrobiana del conservante natural desarrollado



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00414-CPF-2018

ORDEN DE ANÁLISIS
SOLICITADO POR
MUESTRA
NÚMERO DE LOTE
CANTIDAD
FECHA DE RECEPCIÓN
FECHA DE FABRICACIÓN
FECHA DE VENCIMIENTO



: 05047/2018
: CARLOS ENRIQUE CABRERA GARCÍA
: CONSERVARTE NATURAL
: ----
: 02 frascos x 20 mL
: 28 de Agosto del 2018
: ----
: ----

EFICACIA ANTIMICROBIANA:

MICROORGANISMOS	DIÁMETRO DE INHIBICIÓN (mm)		
	MUESTRA AL 100%		
<i>Escherichia coli</i>	13	13	13
<i>Staphylococcus aureus</i>		Inhibición total	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	13	12
<i>Candida albicans</i>	10	10	11
<i>Aspergillus niger</i>	26	27	27

*El tamaño de los pocillos es de 6mm. Las medidas reportadas incluyen el tamaño de los pocillos.
*Concentración del inóculo: 1×10^8 UFC/mL.



Lima, 12 de Setiembre del 2018


QF. Gustavo Guerra Brizuela
Director del Centro de Control Analítico

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"


Jr. Pune N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>

Anexo 10. Protocolo de análisis de eficacia antimicrobiana del control negativo (Placebo)



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00408-CPF-2017

ORDEN DE ANÁLISIS : 04591/2017
 SOLICITADO POR : ANDRÉ HARO CALVO
 MUESTRA : MUESTRA 1 CREMA O/W (Placebo)
 NÚMERO DE LOTE : -----
 CANTIDAD : 100g
 FECHA DE RECEPCIÓN : 30 de Octubre del 2017
 FECHA DE FABRICACIÓN : -----
 FECHA DE VENCIMIENTO : -----

Ensayo: Test de Challenge: Método ISO 11930:2012

1. Recuento Microbiano

Microorganismos	Crema O/W Placebo				
	Tiempos				
	Día 0	Día 2	Día 7	Día 14	Día 28
	UFC/g (unidades formadoras de colonia por gramo de muestra)				
<i>E. coli</i>	1.1 x 10 ⁶	Incontable >1.12 x 10 ⁶	Incontable >1.12 x 10 ⁶	Incontable >1.12 x 10 ⁶	Incontable >1.12 x 10 ⁶
<i>S. aureus</i>	1.0 x 10 ⁶	Incontable >1.01 x 10 ⁶	Incontable >1.01 x 10 ⁶	Incontable >1.01 x 10 ⁶	Incontable >1.01 x 10 ⁶
<i>P. aeruginosa</i>	1.7 x 10 ⁶	Incontable >1.65 x 10 ⁶	Incontable >1.65 x 10 ⁶	Incontable >1.65 x 10 ⁶	Incontable >1.65 x 10 ⁶
<i>C. albicans</i>	1.2 x 10 ⁵	Incontable >1.24 x 10 ⁵	Incontable >1.24 x 10 ⁵	Incontable >1.24 x 10 ⁵	Incontable >1.24 x 10 ⁵
<i>A. niger</i>	1.5 x 10 ⁵	11	11	13	18


2. Reducción Logarítmica Microbiana



Microorganismos	Crema O/W Placebo			
	Tiempos			
	Día 2	Día 7	Día 14	Día 28
<i>E. coli</i>	0 log	0 log	0 log	0 log
<i>S. aureus</i>	0 log	0 log	0 log	0 log
<i>P. aeruginosa</i>	0 log	0 log	0 log	0 log
<i>C. albicans</i>	0 log	0 log	0 log	0 log
<i>A. niger</i>	4 log	NI	NI	NI

NI: No hubo incremento

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
 ☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1
 E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>





UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



3. Límite de Aceptación

Crema O/W Placebo	
Microorganismos	Límite de Aceptabilidad a 28 días
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Inaceptable
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Inaceptable
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Inaceptable
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Inaceptable
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	Inaceptable

Conclusión:

De acuerdo con los criterios de evaluación indicados en la ISO 11930:2012, el sistema conservante del producto "Muestra 1 Crema O/W (Placebo)" no es eficaz contra la proliferación microbiana hasta los 28 días.

Lima, 04 de Diciembre del 2017

Dra. María Elena Salazar Salvatierra
Directora (e) del Centro de Control Analítico




"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>




Anexo 11. Protocolo de análisis de eficacia antimicrobiana del control positivo (sistema conservante de parabenos)



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA

CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00407-CPF-2017

ORDEN DE ANÁLISIS : 04592/2017
 SOLICITADO POR : ANDRÉ HARO CALVO
 MUESTRA : MUESTRA 2 CREMA O/W (Parabenos)
 NÚMERO DE LOTE : -----
 CANTIDAD : 100g
 FECHA DE RECEPCIÓN : 30 de Octubre del 2017
 FECHA DE FABRICACIÓN : -----
 FECHA DE VENCIMIENTO : -----

Ensayo: Test de Challenge: Método ISO 11930:2012


1. Recuento Microbiano

Microorganismos	Crema O/W Parabenos				
	Tiempos				
	Día 0	Día 2	Día 7	Día 14	Día 28
<i>E. coli</i>	1.1×10^6	178	<10	<10	<10
<i>S. aureus</i>	1.0×10^6	6	<10	<10	<10
<i>P. aeruginosa</i>	1.7×10^6	550	<10	<10	<10
<i>C. albicans</i>	1.2×10^5	115	<10	<10	<10
<i>A. niger</i>	1.5×10^5	13	<10	<10	<10

2. Reducción Logarítmica Microbiana

Microorganismos	Crema O/W Parabenos			
	Tiempos			
	Día 2	Día 7	Día 14	Día 28
<i>E. coli</i>	4 log	5 log	NI	NI
<i>S. aureus</i>	5 log	NI	NI	NI
<i>P. aeruginosa</i>	3 log	5 log	NI	NI
<i>C. albicans</i>	3 log	4 log	NI	NI
<i>A. niger</i>	4 log	NI	NI	NI



NI: No hubo incremento



"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
 ☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1
 E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>

ISO 9001
 BUREAU VERITAS
 Certification
N° BR232265



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



3. Límite de Aceptación

Crema O/W Parabenos	
Microorganismos	Límite de Aceptabilidad a 28 días
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Aceptable
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Aceptable
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Aceptable
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Aceptable
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	Aceptable

Conclusión:

De acuerdo con los criterios de evaluación indicados en la ISO 11930:2012, el sistema conservante del producto "Muestra 2 Crema O/W (Parabenos)" es eficaz contra la proliferación microbiana hasta los 28 días, el riesgo microbiológico es aceptable y no es necesario tener en cuenta otros factores que son independientes de la formulación.

Lima, 04 de Diciembre del 2017

Dra. María Elena Salazar Salvatierra
Directora (e) del Centro de Control Analítico



"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"


Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>

ISO 9001

BUREAU VERITAS
Certification




Anexo 12. Protocolo de análisis de eficacia antimicrobiana de la emulsión O/W con 1% del conservante natural desarrollado



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA

CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00406-CPF-2017

ORDEN DE ANÁLISIS : 04593/2017
 SOLICITADO POR : ANDRÉ HARO CALVO
 MUESTRA : MUESTRA 3 CREMA O/W (Conservante natural)
 NÚMERO DE LOTE : ----
 CANTIDAD : 100g
 FECHA DE RECEPCIÓN : 30 de Octubre del 2017
 FECHA DE FABRICACIÓN : ----
 FECHA DE VENCIMIENTO : ----

Ensayo: Test de Challenge: Método ISO 11930:2012

1. Recuento Microbiano

Crema O/W Conservante Natural					
Microorganismos	Tiempos				
	Día 0	Día 2	Día 7	Día 14	Día 28
<i>E. coli</i>	1.1×10^6	34	<10	<10	<10
<i>S. aureus</i>	1.0×10^6	<10	<10	<10	<10
<i>P. aeruginosa</i>	1.7×10^6	3	<10	<10	<10
<i>C. albicans</i>	1.2×10^5	55	<10	<10	<10
<i>A. niger</i>	1.5×10^5	4	<10	<10	<10



2. Reducción Logarítmica Microbiana

Crema O/W Conservante Natural				
Microorganismos	Tiempos			
	Día 2	Día 7	Día 14	Día 28
<i>E. coli</i>	5 log	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i>	5 log	NI	NI	NI
<i>P. aeruginosa</i>	5 log	6 log	NI	NI
<i>C. albicans</i>	3 log	4 log	NI	NI
<i>A. niger</i>	4 log	5 log	NI	NI

NI: No hubo incremento

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
 ☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1
 E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



3. Límite de Aceptación

Crema O/W Conservante Natural	
Microorganismos	Límite de Aceptabilidad a 28 días
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Aceptable
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Aceptable
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Aceptable
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Aceptable
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	Aceptable

Conclusión:

De acuerdo con los criterios de evaluación indicados en la ISO 11930:2012, el sistema conservante del producto "Muestra 3 Crema O/W (Conservante natural)" es eficaz contra la proliferación microbiana hasta los 28 días, el riesgo microbiológico es aceptable y no es necesario tener en cuenta otros factores que son independientes de la formulación.

Lima, 04 de Diciembre del 2017

Dra. María Elena Salazar Salvatierra
Directora (e) del Centro de Control Analítico



"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>


ISO 9001

BUREAU VERITAS
Certification


N° 01233265



Anexo 13. Protocolo de análisis de eficacia antimicrobiana de la emulsión O/W con 0,5% del conservante natural desarrollado



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA




PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00152-CPF-2018

ORDEN DE ANÁLISIS : 004795/2018
SOLICITADO POR : CARLOS ENRIQUE CABRERA GARCÍA
MUESTRA : Crema con conservante natural al 0,5%
NÚMERO DE LOTE : ----
CANTIDAD : 1 pote con 100g
FECHA DE RECEPCIÓN : 06 de Marzo del 2018

Ensayo: Test de Challenge: Método ISO 11930:2012



1. Recuento Microbiano

Crema con conservante natural al 0.5%					
Microorganismo	Tiempos				
	Día 0	Día 2	Día 7	Día 14	Día 28
	UFC/g (unidades formadoras de colonia por gramo de muestra)				
<i>E. coli</i>	1.1 x 10 ⁶	40	<10	<10	<10
<i>S. aureus</i>	1.0 x 10 ⁶	<10	<10	<10	<10
<i>P. aeruginosa</i>	1.7 x 10 ⁶	<10	10	<10	<10
<i>C. albicans</i>	1.2 x 10 ⁵	10	10	<10	<10
<i>A. niger</i>	1.5 x 10 ⁵	<10	<10	<10	<10



"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
 ☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1
 E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



2. Reducción Logarítmica Microbiana

Crema con conservante natural al 0.5%				
Microorganismo	Tiempos			
	Día 2	Día 7	Día 14	Día 28
<i>E. coli</i>	4 log	1 log	NI	NI
<i>S. aureus</i>	5 log	NI	NI	NI
<i>P. aeruginosa</i>	5 log	NI	NI	NI
<i>C. albicans</i>	4 log	NI	NI	NI
<i>A. niger</i>	4 log	NI	NI	NI

3. Límite de Aceptación

Microorganismos	Límite de Aceptabilidad a 28 días
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	ACEPTABLE
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	ACEPTABLE
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	ACEPTABLE
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	ACEPTABLE
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	ACEPTABLE

CONCLUSIÓN:

De acuerdo con los criterios de evaluación indicados en la ISO 11930:2012, el sistema conservante del producto "Crema con conservante natural al 0.5%" es eficaz contra la proliferación microbiana hasta los 28 días, el riesgo microbiológico es aceptable y no es necesario tener en cuenta otros factores que son independientes de la formulación.

Lima, 12 de Abril del 2018

Q.F. Gustavo Guerra Brizuela
Director del Centro de Control Analítico




"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>


ISO 9001
BUREAU VERITAS
Certification



Anexo 13. Protocolo de análisis de eficacia antimicrobiana de la emulsión O/W con 0,25% del conservante natural desarrollado



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00153-CPF-2018

ORDEN DE ANÁLISIS : 004794/2018
SOLICITADO POR : CARLOS ENRIQUE CABRERA GARCÍA
MUESTRA : Crema con conservante natural al 0,25%
NÚMERO DE LOTE : ----
CANTIDAD : 1 pote con 100g
FECHA DE RECEPCIÓN : 06 de Marzo del 2018


Ensayo: Test de Challenge: Método ISO 11930:2012

1. Recuento Microbiano


Crema con conservante natural al 0.25%					
Microorganismo	Tiempos				
	Día 0	Día 2	Día 7	Día 14	Día 28
	UFC/g (unidades formadoras de colonia por gramo de muestra)				
<i>E. coli</i>	1.1 x 10 ⁶	30	<10	<10	<10
<i>S. aureus</i>	1.0 x 10 ⁶	45	<10	<10	<10
<i>P. aeruginosa</i>	1.7 x 10 ⁶	35	25	10	10
<i>C. albicans</i>	1.2 x 10 ⁵	15	10	<10	<10
<i>A. niger</i>	1.5 x 10 ⁵	<10	<10	<10	<10

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
 ☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1
 E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>



ISO 9001
BUREAU VERITAS
Certification
N° BR233265



UKAS
MANAGEMENT
SYSTEMS
008



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



2. Reducción Logarítmica Microbiana

Crema con conservante natural al 0.25%				
Microorganismo	Tiempos			
	Día 2	Día 7	Día 14	Día 28
<i>E. coli</i>	5	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i>	4	1	NI	NI
<i>P. aeruginosa</i>	5	NI	NI	NI
<i>C. albicans</i>	4	NI	NI	NI
<i>A. niger</i>	4	NI	NI	NI

3. Límite de Aceptación

Microorganismos	Límite de Aceptabilidad a 28 días
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	ACEPTABLE
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	ACEPTABLE
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	ACEPTABLE
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	ACEPTABLE
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	ACEPTABLE

CONCLUSIÓN:

De acuerdo con los criterios de evaluación indicados en la ISO 11930:2012, el sistema conservante del producto "Crema con conservante natural al 0.25%" es eficaz contra la proliferación microbiana hasta los 28 días, el riesgo microbiológico es aceptable y no es necesario tener en cuenta otros factores que son independientes de la formulación.

Lima, 12 de Abril del 2018

Q.F. Gustavo Guerra Brizuela
Director del Centro de Control Analítico



"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>


ISO 9001

BUREAU VERITAS
Certification


N° 0R233265



Anexo 14. Protocolo de análisis de eficacia antimicrobiana de la emulsión O/W con 0,25% del conservante natural en condiciones de estabilidad acelerada



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00457-CPF-2018



ORDEN DE ANÁLISIS	: 05043/2018
SOLICITADO POR	: CARLOS ENRIQUE CABRERA GARCÍA
MUESTRA	: CREMA O/W 0.25% (MUESTRA ESTABILIDAD)
NÚMERO DE LOTE	: —
CANTIDAD	: 01 pote x 100g
FECHA DE RECEPCIÓN	: 27 de Agosto del 2018
FECHA DE FABRICACIÓN	: —
FECHA DE VENCIMIENTO	: —

TEST CHALLENGE
CREMA O/W 0.25%

MICROORGANISMOS	LÍMITE DE ACEPTABILIDAD A 28 DÍAS
<i>Escherichia coli</i> ATCC8739	Acceptable
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Acceptable
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Acceptable
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	Acceptable
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	Acceptable

Conclusión: De acuerdo a los criterios de evaluación indicados en la ISO 11930:2012, el sistema conservante del producto "Crema O/W 0.25% (MUESTRA ESTABILIDAD)" es eficaz contra la proliferación microbiana hasta los 28 días, el riesgo microbiológico es aceptable y no es necesario tener en cuenta otros factores que son independientes de la formulación.



Lima, 15 de Octubre del 2018


QF. Gustavo Guerra Brizuela
Director del Centro de Control Analítico

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"


Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>

Anexo 15. Protocolo de análisis de eficacia antimicrobiana de la emulsión W/O con 0,25% del conservante natural en condiciones de estabilidad acelerada



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00458-CPF-2018


ORDEN DE ANÁLISIS	: 05044/2018
SOLICITADO POR	: CARLOS ENRIQUE CABRERA GARCÍA
MUESTRA	: CREMA W/O 0.25% (MUESTRA ESTABILIDAD)
NÚMERO DE LOTE	: ---
CANTIDAD	: 01 pote x 100g
FECHA DE RECEPCIÓN	: 27 de Agosto del 2018
FECHA DE FABRICACIÓN	: ---
FECHA DE VENCIMIENTO	: ---

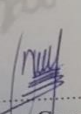
**TEST CHALLENGE
CREMA W/O 0.25%**

MICROORGANISMOS	LÍMITE DE ACEPTABILIDAD A 28 DÍAS
<i>Escherichia coli</i> ATCC8739	Aceptable
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Aceptable
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Aceptable
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	Aceptable
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	Aceptable

Conclusión: De acuerdo a los criterios de evaluación indicados en la ISO 11930:2012, el sistema conservante del producto "Crema W/O 0.25% (MUESTRA ESTABILIDAD)" es eficaz contra la proliferación microbiana hasta los 28 días, el riesgo microbiológico es aceptable y no es necesario tener en cuenta otros factores que son independientes de la formulación.

Lima, 15 de Octubre del 2018




QF. Gustavo Guerra Brizuela
 Director del Centro de Control Analítico

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
 ☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1
 E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>

